

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**Departamento de Biología Vegetal II**



**TESIS DOCTORAL**

**Estudio con criterios filogenéticos del potencial neuroprotector de  
líquenes parmeliáceos: mecanismos de acción de sus metabolitos  
secundarios**

**Study with filogenetic criteria of the neuroprotective potential of  
"Parmeliaceae" lichens: mechanism of action of their secondary  
metabolites**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Carlos Fernández Moriano**

Directores

**M. Pilar Gómez-Serranillos Cuadrado  
Pradeep Kumar Divakar**

**Madrid, 2018**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTOS DE FARMACOLOGÍA Y BIOLOGÍA VEGETAL II



**ESTUDIO CON CRITERIOS FILOGENÉTICOS DEL  
POTENCIAL NEUROPROTECTOR DE LÍQUENES  
PARMELIÁCEOS. MECANISMO DE ACCIÓN DE SUS  
METABOLITOS SECUNDARIOS.**

**TESIS DOCTORAL CON MENCIÓN EUROPEA**

**CARLOS FERNÁNDEZ MORIANO**

**DIRIGIDA POR:**

**DRA. M. PILAR GÓMEZ-SERRANILLOS CUADRADO**

**DR. PRADEEP KUMAR DIVAKAR**

**MADRID, 2017**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTOS DE FARMACOLOGÍA Y BIOLOGÍA VEGETAL II



**ESTUDIO CON CRITERIOS FILOGENÉTICOS DEL  
POTENCIAL NEUROPROTECTOR DE LÍQUENES  
PARMELIÁCEOS. MECANISMO DE ACCIÓN DE SUS  
METABOLITOS SECUNDARIOS.**

**TESIS DOCTORAL CON MENCIÓN EUROPEA**

**CARLOS FERNÁNDEZ MORIANO**

MADRID, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTOS DE FARMACOLOGÍA Y BIOLOGÍA VEGETAL II



**STUDY WITH PHYLOGENETIC CRITERIA OF THE  
NEUROPROTECTIVE POTENTIAL OF *PARMELIACEAE*  
LICHENS. MECHANISM OF ACTION OF THEIR  
SECONDARY METABOLITES.**

**TESIS DOCTORAL CON MENCIÓN EUROPEA**

**CARLOS FERNÁNDEZ MORIANO**

MADRID, 2017





UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

**Dra. M. Pilar Gómez-Serranillos Cuadrado**, Profesora Titular del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, y **Dr. Pradeep Kumar Divakar**, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Biología Vegetal II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación titulado **“Estudio con criterios filogenéticos del potencial neuroprotector de líquenes parmeliáceos. Mecanismo de acción de sus metabolitos secundarios”** constituye la memoria de Tesis Doctoral que presenta D. **Carlos Fernández Moriano** para optar al grado de Doctor con Mención Europea, y que ha sido realizado en los Departamentos de Farmacología y Biología Vegetal II, ambos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, bajo nuestra dirección.

Asimismo, concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos su presentación y defensa en la Universidad Complutense de Madrid, para que sea juzgado por el Tribunal correspondiente.

Para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Madrid a 16 de enero de dos mil diecisiete.

Dra. M. Pilar Gómez-Serranillos Cuadrado

Dr. Pradeep Kumar Divakar

Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido realizado en los **Departamentos de Farmacología y Biología Vegetal II** de la **Facultad de Farmacia** de la **Universidad Complutense de Madrid** gracias a una beca pre-doctoral de **Formación de Profesorado Universitario (FPU)** del **Ministerio de Educación, Cultura y Deporte** (FPU 12/03824) concedida a Carlos Fernández Moriano.



Durante el desarrollo de la Tesis Doctoral se ha realizado una estancia breve de tres meses, también financiada por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte e incluida en el programa formativo de Formación de Profesorado Universitario (FPU). Dicha estancia se ha realizado en el **Senckenberg Biodiveristy and Climate Research Centre (Bik-F)** (Frankfurt, Alemania), en el grupo de investigación de Adaptación y Clima dirigido por la Dra. Imke Schmitt.



**BiK<sup>F</sup>** | Biodiversität und Klima  
Forschungszentrum





## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido realizado gracias a la financiación proporcionada por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte a través del programa de Formación de Profesorado Universitario. El proyecto de investigación de la Tesis Doctoral se ha desarrollado entre los grupos de investigación *SYSTEMOL* (del departamento de Biología Vegetal II) y *Farmacología de Productos Naturales* (del departamento de Farmacología), ambos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, y bajo la financiación del proyecto CGL2013-42498-P del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. Mi agradecimiento a las mencionadas instituciones.

Mi más sincera gratitud a mis directores de Tesis, la Dra. M. Pilar Gómez-Serranillos Cuadrado y el Dr. Pradeep Kumar Divakar, así como a la Dra. Ana M. Crespo de las Casas, por haberme dado la oportunidad de desarrollar este trabajo bajo su sabia y profesional tutela y haberme apoyado desde el comienzo, ayudándome desde la obtención de la beca FPU hace cuatro años. Mucho han contribuido ellos a que esta tesis sea hoy presentada. Quiero hacer especial énfasis en mi agradecimiento a Pilar, por su trato cercano y cariñoso hacia mí y la ayuda y paciencia en el día a día.

A lo largo de estos años he recibido, además, apoyo de muchas personas que, de una manera u otra, me han ayudado y facilitado mi trabajo y han contribuido a que este trabajo de Tesis Doctoral se haya materializado en la presente memoria. Quiero agradecer a todo el profesorado del Departamento de Farmacología, y a todos mis compañeros de módulo y departamento que en algún momento fueron doctorandos (Elena, Alba, Manal, María, Ana, etc.), con quien he compartido la rutina diaria y de quienes he aprendido muchas cosas y, sobre todo, por su ayuda para sacar adelante mi trabajo experimental. Y a Rosa, Nieves, Azucena y Jesús, por su ayuda desinteresada y su buen humor diarios. También tengo que agradecer a parte del personal del Departamento de Biología Vegetal II (Tino, David, Juan Carlos, etc.) por su buena disposición a la colaboración que ha dado lugar al presente trabajo.

On the other hand, I do want to thank much Professor Imke Schmitt for giving me the opportunity to spend three fruitful and wonderful months working in her research group in the Biodiversity and Climate Research Centre (Frankfurt). I appreciate the kindness and help provided by her and all the members of the group, and I would like to give special thanks to Dr. Francesco Dal Grande for his kindness and for making my stay more comfortable and lightening up my work there.

Tengo mucho que agradecer a todos mis amigos, a los de siempre y a los más recientes, por estar en los buenos momentos y en los no tan buenos, y porque sin ellos todos estos años desde que inicié los estudios de Licenciatura en Farmacia no hubieran sido lo mismo. Muchos son parte de esa familia que uno elige para disfrutar el tiempo.

Pero mi mayor agradecimiento va dirigido a mi familia, porque es lo verdaderamente importante en la vida. Y porque esta tesis no sólo es fruto de mi trabajo durante los últimos cuatro años, sino que es resultado de toda la educación recibida en casa desde pequeño, y toma cuerpo gracias al continuo apoyo, comprensión y cariño recibido de ellos.

Por último, GRACIAS a Laura, por tu apoyo y por compartir la vida conmigo. Gracias por todo en general y por nada en particular. Las palabras sobran, y debes sentirte partícipe de este trabajo.

***A mis abuelos***



# ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

## FIGURAS

Figura 1. Sección transversal de un talo liquénico tipo.

Figura 2. Distribución geográfica de los líquenes parmeliáceos.

Figura 3. Especímenes representativos de las especies *Cetrelia braunsiana*, *Cetraria islandica*, *Evernia prunastri*, *Parmotrema saccatilobum*, *Usnea ghattensis* y *Vulpicida canadensis*.

Figura 4. Clasificación filogenética de la familia *Parmeliaceae* y distribución de las especies objeto de estudio en los distintos clados.

Figura 5. Estructuras químicas de ejemplos de metabolitos secundarios de líquenes según grupos de estructuras.

Figura 6. Clasificación de los metabolitos liquénicos según rutas biosintéticas.

Figura 7. Dibujo esquemático que representa las principales unidades funcionales del SNC.

Figura 8. Estructura de la BHE.

Figura 9. Desequilibrio entre especies pro-oxidantes y antioxidantes que conduce al EO.

Figura 10. Las actividades de las enzimas antioxidantes se encuentran interconectadas por las ERO intermedias.

Figura 11. Bioquímica del estrés oxidativo. Adaptada de Halliwell, 2007.

Figura 12. Estructura del factor Nrf2 con sus distintos dominios, y esquema representativo de la activación del sistema de señalización celular Keap-1/Nrf2/ARE.

Figura 13. Microfotografías representativas de la morfología de las líneas celulares utilizadas.

Figura 14. Fotografía del cromatógrafo de HPLC Agilent 1260 Infinity usado para el análisis fitoquímico de los extractos de líquenes parmeliáceos.

Figura 15. Esquema explicativo del procedimiento para el ensayo de MTT.

Figura 16. Ejemplo de una placa del ensayo DPPH.

Figura 17. Fundamento del empleo de la DCFH-DA para la medida de la generación intracelular de ERO.

Figura 18. Cromatograma representativo de una muestra de MDA patrón (5  $\mu$ M).

Figura 19. Ejemplo de curva patrón de trolox y su regresión lineal de área bajo la curva.

Figura 20. Resultados de viabilidad celular de la línea SH-SY5Y bajo los tratamientos (24 h) con los seis extractos metanólicos.

Figura 21. Resultados de viabilidad celular de la línea U373-MG bajo los tratamientos (24 h) con los seis extractos metanólicos.

Figura 22. Resultados del ensayo de actividad LDH bajo los distintos tratamientos (24 h) con los extractos metanólicos. Modelo celular SH-SY5Y.

Figura 23. Resultados del ensayo de actividad LDH bajo los distintos tratamientos (24 h) con los extractos metanólicos. Modelo celular U373-MG.

Figura 24. Efecto citoprotector de los extractos metanólicos en estudio frente al estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el modelo celular SH-SY5Y.

Figura 25. Efecto citoprotector de los extractos metanólicos en estudio frente al estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el modelo celular U373-MG.

Figura 26. Efecto de los extractos liquénicos sobre la morfología de las células SH-SY5Y.

Figura 27. Efecto de los extractos liquénicos sobre la morfología de las células U373-MG.

Figura 28. Efectos de los extractos liquénicos sobre la producción de ERO intracelulares. Modelo celular SH-SY5Y.

Figura 29. Efectos de los extractos líquénicos sobre la producción de ERO intracelulares. Modelo celular U373-MG.

Figura 30. Cuantificación de los niveles de MDA en el modelo celular SH-SY5Y.

Figura 31. Cuantificación de los niveles de MDA en el modelo celular U373-MG.

Figura 32. Efectos de los extractos metanólicos sobre los niveles del sistema antioxidante glutatión en el modelo celular SH-SY5Y.

Figura 33. Efectos de los extractos metanólicos sobre los niveles del sistema antioxidante glutatión en el modelo celular U373-MG.

Figura 34. Resultados de viabilidad celular de las líneas celulares HepG2 (A) y MCF-7 (B) bajo los tratamientos con extractos metanólicos de líquenes parmeliáceos.

Figura 35. Cromatogramas adquiridos a 254 nm para los seis extractos metanólicos e identificación de sus componentes mayoritarios.

Figura 36. Espectros UV (190-400 nm) obtenidos para los picos mayoritarios en los cromatogramas de los extractos y para los compuestos aislados por HPLC semi-preparativa de *Evernia prunastri* (A) y *Cetraria islandica* (B).

Figura 37. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  obtenido para los ácidos evérnico (A) y fumarprotocetrárico (B), aislados de sus respectivos extractos líquénicos por HPLC semipreparativa.

Figura 38. Resultados de viabilidad celular de la línea celular SH-SY5Y bajo los tratamientos (24 h) con los cuatro metabolitos líquénicos.

Figura 39. Resultados de viabilidad celular de la línea celular U373-MG bajo los tratamientos (24 h) con los cuatro metabolitos líquénicos.

Figura 40. Resultados del ensayo de actividad LDH bajo los distintos tratamientos (24 h) con metabolitos líquénicos. Modelo celular SH-SY5Y.

Figura 41. Resultados del ensayo de actividad LDH bajo los distintos tratamientos (24 h) con metabolitos líquénicos. Modelo celular U373-MG.

Figura 42. Efecto citoprotector de los metabolitos líquénicos frente al estrés oxidativo inducido por  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el modelo celular SH-SY5Y.

Figura 43. Efecto citoprotector de los metabolitos líquénicos frente al estrés oxidativo inducido por  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el modelo celular U373-MG.

Figura 44. Efecto de los metabolitos líquénicos sobre la morfología de las células SH-SY5Y.

Figura 45. Efecto de los metabolitos líquénicos sobre la morfología de las células U373-MG.

Figura 46. Efectos de los compuestos líquénicos sobre la producción de ERO intracelulares. Modelo celular SH-SY5Y.

Figura 47. Efectos de los compuestos líquénicos sobre la producción de ERO intracelulares. Modelo celular U373-MG.

Figura 48. Cuantificación de los niveles de MDA. Modelo celular SH-SY5Y.

Figura 49. Cuantificación de los niveles de MDA. Modelo celular U373-MG.

Figura 50. Efectos sobre los niveles del sistema antioxidante glutatión. Modelo celular SH-SY5Y.

Figura 51. Efectos sobre los niveles del sistema antioxidante glutatión. Modelo U373-MG.

Figura 52. Efecto de los metabolitos líquénicos sobre los niveles de las enzimas antioxidantes CAT, SOD-1, SOD-2, GPx, GR y HO-1 en el modelo celular SH-SY5Y.

Figura 53. Efecto de los metabolitos líquénicos sobre los niveles de las enzimas antioxidantes CAT, SOD-1, SOD-2, GPx, GR y HO-1 en el modelo celular U373-MG.

Figura 54. Efecto de los compuestos líquénicos sobre la expresión proteica del factor Nrf2 nuclear y citoplasmático en el modelo celular SH-SY5Y.

- Figura 55. Efecto de los compuestos liquénicos sobre la expresión proteica del Nrf2 nuclear y citoplasmático en el modelo celular U373-MG.
- Figura 56. Efecto de los compuestos liquénicos sobre la actividad del factor Nrf2 para la unión al ADN. Modelo celular SH-SY5Y.
- Figura 57. Efecto de los compuestos liquénicos sobre la actividad del factor Nrf2 para la unión al ADN. Modelo celular U373-MG.
- Figura 58. Efecto de los compuestos liquénicos sobre el potencial de membrana mitocondrial en el modelo celular SH-SY5Y.
- Figura 59. Efecto de los compuestos liquénicos sobre el potencial de membrana mitocondrial en el modelo celular U373-MG.
- Figura 60. Efecto de los compuestos liquénicos sobre la actividad de la enzima caspasa-3 en el modelo celular SH-SY5Y.
- Figura 61. Efecto de los compuestos liquénicos sobre la actividad de la enzima caspasa-3 en el modelo celular U373-MG.
- Figura 62. Efecto sobre la expresión proteica de marcadores de apoptosis. Modelo celular SH-SY5Y.
- Figura 63. Efecto sobre la expresión proteica de marcadores de apoptosis. Modelo celular U373-MG.
- Figura 64. Efecto de los compuestos liquénicos sobre la expresión proteica de LC3-I y LC3-II, como marcadores del flujo autofágico, en el modelo celular SH-SY5Y.
- Figura 65. Efecto de los compuestos liquénicos sobre la viabilidad celular de la línea celular RBE4.
- Figura 66. Captación de los compuestos liquénicos por las células RBE4.
- Figura 67. Efecto de los compuestos liquénicos sobre la viabilidad celular del modelo celular hCMEC/D3.
- Figura 68. Resultados de viabilidad celular de las líneas celulares HepG2 y MCF-7 tras el tratamiento (24 h) con los compuestos liquénicos.
- Figura 69. Fotografías representativas de distintas fases del cultivo del micobionte de *Cetraria islandica*.
- Figura 70. Cromatogramas adquiridos a 254 nm de los extractos metanólicos obtenidos a partir del talo liquénico del espécimen de *Cetraria islandica* usado para establecer el cultivo, y a partir del micobionte en cultivo.
- Figura 71. Imágenes obtenidas por transiluminación tras la electroforesis de la muestra de ADN en un gel de agarosa 1%.
- Figura 72. Asignación taxonómica de los *scaffolds* resultantes del ensamblaje del genoma de *Cetraria islandica*.
- Figura 73. Estructura del *cluster* biosintético identificado como posible candidato de la síntesis de ácido fumarprotocetrárico.
- Figura 74. Árbol filogenético obtenido por inferencia basada en el principio de máxima verosimilitud de las secuencias KS.
- Figura 75. Estructuras químicas de los 4 metabolitos secundarios investigados.
- Figura 76. Estructuras químicas del ácido fumarprotocetrárico y del ácido grayánico.
- Figura 77. Clado de interés en que se agrupan con un alto nivel de consistencia la PKS tipo I de *Cetraria islandica* (*scaffold* 270) con la PKS identificada como responsable de la síntesis del ácido grayánico en *Cladonia grayi*.
- Figura 78. Ruta biosintética propuesta para el ácido grayánico en *C. grayi*, adaptada de Armaleo y col. (2011).

## TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la familia *Parmeliaceae*.



Tabla 2. Géneros de líquenes más utilizados en medicina tradicional y su correspondiente área geográfica principal de uso.

Tabla 3. Resumen de los principales géneros de *Parmeliaceae* de los que se ha estudiado alguna propiedad farmacológica.

Tabla 4. Principales metabolitos identificados en líquenes parmeliáceos de los que se ha estudiado alguna actividad farmacológica.

Tabla 5. Estudios en cultivos celulares *in vitro* sobre propiedades antioxidantes de líquenes parmeliáceos.

Tabla 6. Estudios *in vivo* que evalúan parámetros sobre propiedades antioxidantes de líquenes.

Tabla 7. Principales ERO intracelulares junto a las principales reacciones en que se generan.

Tabla 8. Resumen de algunos compuestos antioxidantes de origen natural evaluados en ensayos clínicos de enfermedades neurodegenerativas.

Tabla 9. Datos identificativos de los seis especímenes de *Parmeliaceae* utilizados.

Tabla 10. Composición de los reactivos utilizados en la técnica de Western Blot.

Tabla 11. Rendimientos de la extracción en metanol de los especímenes liquénicos, y su contenido en polifenoles.

Tabla 12. Resultados obtenidos para los extractos metanólicos de las distintas especies en estudio en los ensayos de actividad captadora de RL.

Tabla 13. Concentraciones seleccionadas por ejercer el mayor efecto citoprotector para cada extracto liquénico y línea celular.

Tabla 14. Concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) obtenida para cada extracto metanólico y cada modelo celular de células cancerígenas.

Tabla 15. Tiempos de retención (media  $\pm$  desviación estándar) y datos del espectro UV de los picos identificados en los cromatogramas.

Tablas 16. Resultados obtenidos para los metabolitos liquénicos en los ensayos de actividad captadora de RL.

Tabla 17. Concentraciones seleccionadas por ejercer el mayor efecto citoprotector para cada compuesto liquénico y modelo celular.

Tabla 18. Efectos de los compuestos liquénicos sobre los niveles de calcio mitocondrial en los modelos celulares SH-SY5Y y U373-MG.

Tabla 19. Efectos de los compuestos liquénicos sobre los niveles de calcio citosólico en los modelos celulares SH-SY5Y y U373-MG.

Tabla 20. Propiedades físico-químicas y descriptores moleculares de los metabolitos liquénicos.

Tabla 21. Permeabilidad aparente de los compuestos liquénicos a través del modelo de celular de BHE (modelo celular hCMEC/D3).

Tabla 22. Concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) obtenida para cada compuesto y cada línea celular.

Tabla 23. Principales características del ensamblaje del genoma de *Cetraria islandica*.

Tabla 24. Predicción de genes biosintéticos en el genoma de *Cetraria islandica*.

Tabla 25. Compuestos identificados por HPLC en los extractos metanólicos de las seis especies de líquenes parmeliáceos, así como los artículos que respaldan los hallazgos de composición química en cada espécimen.

## ÍNDICE

---

<b>LISTADO DE ABREVIATURAS</b>	<b>1</b>
<b>RESÚMEN / SUMMARY</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN – REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>11</b>
<b>1. Líquenes</b>	<b>12</b>
1.1. Introducción	12
1.1.1. Características generales	12
1.1.2. Clasificación taxonómica	15
1.1.3. Código de barras molecular	16
1.2. Familia <i>Parmeliaceae</i>	18
1.2.1. Descripción taxonómica y botánica	18
1.2.2. Distribución geográfica	19
1.2.3. Filogenia de la familia	20
1.2.4. Especies incluidas en el trabajo	22
1.3. Fitoquímica y metabolismo secundario	26
1.3.1. Composición química de los líquenes	26
1.3.2. Metabolitos secundarios	27
1.3.3. Rutas biosintéticas	30
1.3.4. Enzimas poliquétido-sintasas (PKS)	32
1.3.5. Bioactividad de los metabolitos secundarios	33
1.4. Propiedades farmacológicas	35
1.4.1. Uso etnomedicinal	35
1.4.2. Actividades farmacológicas de los líquenes parmeliáceos	38
1.4.3. Actividades antioxidantes y neuroprotectoras	43
<b>2. Estrés oxidativo y Enfermedades Neurodegenerativas</b>	<b>48</b>
2.1. Sistema Nervioso Central	48
2.1.1. Características generales	48
2.1.2. Unidades funcionales	48
2.1.3. Barrera Hematoencefálica	51
2.2. Estrés oxidativo	54
2.2.1. Concepto	54
2.2.2. Especies reactivas de oxígeno (ERO)	56
2.2.3. Protección frente a estrés oxidativo - sistemas antioxidantes	58
2.2.3.1. Productos naturales	61
2.2.4. Implicaciones del daño oxidativo a nivel celular	63
2.2.5. Vías de señalización celular implicadas en estrés oxidativo	66
2.2.5.1. Vía del Nrf2	67
2.3. El estrés oxidativo en enfermedades neurodegenerativas	69
2.3.1. Estrés oxidativo en la enfermedad de Alzheimer	71
2.3.2. Estrés oxidativo en la enfermedad de Parkinson	72
2.3.3. Estrés oxidativo en otras enfermedades neurodegenerativas	72
2.4. Estrategias de neuroprotección	74
2.4.1. Antioxidantes: relevancia de los compuestos naturales	75
2.4.2. Mecanismos novedosos de neuroprotección	78
<b>3. Justificación y objetivos del trabajo</b>	<b>82</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>85</b>
<b>1. Material</b>	<b>86</b>
1.1. Material liquénico	86

1.2.	Líneas celulares	87
1.2.1.	Líneas utilizadas para el estudio de actividad antioxidante y neuroprotectora	87
1.2.2.	Líneas utilizadas para el estudio de paso a través de BHE	87
1.2.3.	Líneas utilizadas para el estudio del potencial anticancerígeno	88
1.3.	Equipos de laboratorio, material fungible y reactivos químicos	89
<b>2.</b>	<b>Métodos</b>	<b>92</b>
2.1.	Estudio fitoquímico	92
2.1.1.	Preparación de los extractos líquénicos	92
2.1.2.	Contenido de compuestos fenólicos	92
2.1.3.	Cromatografía líquida de alta eficacia	93
2.1.4.	Aislamiento de los metabolitos secundarios	94
2.2.	Cultivos celulares	95
2.2.1.	Condiciones de cultivo	95
2.2.2.	Técnicas de subcultivo celular	96
2.2.3.	Congelación/descongelación de líneas celulares	97
2.3.	Tratamientos celulares	97
2.3.1.	Preparación de las muestras	98
2.3.2.	Modelo de estrés oxidativo	98
2.4.	Estudio farmacológico	99
2.4.1.	Determinación de la viabilidad celular y citotoxicidad	99
2.4.1.1.	Ensayo de reducción del MTT	99
2.4.1.2.	Ensayo de actividad LDH	100
2.4.1.3.	Estudios morfológicos	101
2.4.2.	Estudio de la actividad citoprotectora frente a estrés oxidativo	101
2.4.3.	Preparación de los extractos celulares	102
2.4.3.1.	Extractos totales	102
2.4.3.2.	Extractos citosólicos y nucleares	102
2.4.4.	Medida de la concentración de proteínas	103
2.4.5.	Evaluación de las capacidades antioxidante y neuroprotectora <i>in vitro</i>	104
2.4.5.1.	Pruebas químicas de captación de radicales libres	104
2.4.5.1.1.	ORAC	104
2.4.5.1.2.	DPPH	105
2.4.5.2.	Marcadores de estrés oxidativo	106
2.4.5.2.1.	Generación intracelular de ERO	106
2.4.5.2.2.	Peroxidación lipídica	107
2.4.5.2.3.	Sistema antioxidante glutatión	108
2.4.5.3.	Expresión de proteínas por técnica de Western Blot	109
2.4.5.4.	Marcadores de disfunción mitocondrial y apoptosis	112
2.4.5.4.1.	Potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ )	112
2.4.5.4.2.	Niveles de calcio mitocondrial	113
2.4.5.4.3.	Niveles de calcio citosólico	114
2.4.5.4.4.	Actividad de la enzima caspasa-3	115
2.4.5.4.5.	Marcadores proteicos de apoptosis	115
2.4.5.5.	Activación de la vía Nrf2	116
2.4.5.6.	Estudio del flujo autofágico	117
2.4.6.	Evaluación del potencial anticancerígeno	118
2.4.6.1.	Citotoxicidad frente a líneas celulares cancerígenas	118
2.5.	Estudios de paso a través de BHE	118
2.5.1.	Propiedades moleculares de los compuestos	118
2.5.2.	Cinética de captación ("uptake")	119
2.5.3.	Estudios de permeabilidad: modelo de BHE	120
2.6.	Estudio filogenómico del micobionte de <i>Cetraria islandica</i>	122
2.6.1.	Secuenciación y ensamblaje del genoma	122
2.6.1.1.	Cultivo del micobionte	122
2.6.1.2.	Análisis fitoquímico	124

2.6.1.3.	Secuenciación del genoma	124
2.6.1.4.	Ensamblaje de los <i>contigs</i> y <i>scaffolding</i>	125
2.6.2.	Anotación del genoma y predicción de genes biosintéticos	127
2.6.3.	Análisis de la filogenia de secuencias proteicas de KS	128
2.7.	Análisis estadístico de los datos	129

## RESULTADOS 130

### 1. Estudio de la actividad farmacológica de los extractos metanólicos de líquenes parmeliáceos 131

1.1.	Rendimiento de la extracción y contenido en polifenoles	131
1.2.	Actividades antioxidante y neuroprotectora en un modelo celular de EO	132
1.2.1.	Capacidad de captación de radicales libres	132
1.2.2.	Estudio de la viabilidad celular y citotoxicidad	133
1.2.2.1.	Ensayo de reducción de MTT	133
1.2.2.1.1.	Modelo celular SH-SY5Y	134
1.2.2.1.2.	Modelo celular U373-MG	134
1.2.2.2.	Ensayo de actividad LDH	135
1.2.2.2.1.	Modelo celular SH-SY5Y	136
1.2.2.2.2.	Modelo celular U373-MG	136
1.2.3.	Estudio de la actividad citoprotectora frente a estrés oxidativo	137
1.2.3.1.	Ensayo de reducción de MTT	137
1.2.3.1.1.	Modelo celular SH-SY5Y	137
1.2.3.1.2.	Modelo celular U373-MG	139
1.2.4.	Estudio de la morfología celular	140
1.2.4.1.	Modelo celular SH-SY5Y	141
1.2.4.2.	Modelo celular U373-MG	142
1.2.5.	Marcadores de estrés oxidativo	143
1.2.5.1.	Generación intracelular de ERO	143
1.2.5.1.1.	Modelo celular SH-SY5Y	143
1.2.5.1.2.	Modelo celular U373-MG	144
1.2.5.2.	Peroxidación lipídica	146
1.2.5.2.1.	Modelo celular SH-SY5Y	146
1.2.5.2.2.	Modelo celular U373-MG	147
1.2.5.3.	Glutación reducido y oxidado	148
1.2.5.3.1.	Modelo celular SH-SY5Y	148
1.2.5.3.2.	Modelo celular U373-MG	149
1.3.	Potencial anticancerígeno	150

### 2. Estudio fitoquímico de los extractos liquénicos 152

2.1.	Caracterización química de los extractos metanólicos	152
2.2.	Aislamiento e identificación de los metabolitos	154

### 3. Estudio de la actividad farmacológica de los metabolitos secundarios aislados de líquenes parmeliáceos 157

3.1.	Actividades antioxidante y neuroprotectora en un modelo celular de EO	157
3.1.1.	Capacidad de captación de radicales libres	157
3.1.2.	Estudio de la viabilidad celular y citotoxicidad	158
3.1.2.1.	Ensayo de reducción de MTT	158
3.1.2.1.1.	Modelo celular SH-SY5Y	158
3.1.2.1.2.	Modelo celular U373-MG	159
3.1.2.2.	Ensayo de actividad LDH	160
3.1.2.2.1.	Modelo celular SH-SY5Y	160
3.1.2.2.2.	Modelo celular U373-MG	161
3.1.3.	Estudio de la actividad citoprotectora frente a estrés oxidativo	162

3.1.3.1.	Ensayo de reducción de MTT	162
3.1.3.1.1.	Modelo celular SH-SY5Y	162
3.1.3.1.2.	Modelo celular U373-MG	163
3.1.4.	Estudio de la morfología celular	165
3.1.4.1.	Modelo celular SH-SY5Y	165
3.1.4.2.	Modelo celular U373-MG	166
3.1.5.	Marcadores de estrés oxidativo	167
3.1.5.1.	Generación intracelular de ERO	167
3.1.5.1.1.	Modelo celular SH-SY5Y	167
3.1.5.1.2.	Modelo celular U373-MG	168
3.1.5.2.	Peroxidación lipídica	170
3.1.5.2.1.	Modelo celular SH-SY5Y	170
3.1.5.2.2.	Modelo celular U373-MG	171
3.1.5.3.	Glutación reducido y oxidado	172
3.1.5.3.1.	Modelo celular SH-SY5Y	172
3.1.5.3.2.	Modelo celular U373-MG	173
3.1.6.	Efecto sobre el sistema antioxidante enzimático	174
3.1.6.1.	Modelo celular SH-SY5Y	174
3.1.6.2.	Modelo celular U373-MG	178
3.1.7.	Estudio de la activación de la vía Nrf2	182
3.1.7.1.	Determinación de los niveles celulares de Nrf2	182
3.1.7.1.1.	Modelo celular SH-SY5Y	182
3.1.7.1.2.	Modelo celular U373-MG	184
3.1.7.2.	Actividad de unión al ADN nuclear	184
3.1.7.2.1.	Modelo celular SH-SY5Y	186
3.1.7.2.2.	Modelo celular U373-MG	186
3.1.8.	Estudio de la función mitocondrial	188
3.1.8.1.	Potencial de membrana mitocondrial	188
3.1.8.1.1.	Modelo celular SH-SY5Y	188
3.1.8.1.2.	Modelo celular U373-MG	189
3.1.8.2.	Niveles de calcio mitocondrial	190
3.1.8.2.1.	Modelo celular SH-SY5Y	190
3.1.8.2.2.	Modelo celular U373-MG	190
3.1.8.3.	Niveles de calcio citosólico	191
3.1.8.3.1.	Modelo celular SH-SY5Y	192
3.1.8.3.2.	Modelo celular U373-MG	192
3.1.9.	Estudio de los efectos sobre la apoptosis	193
3.1.9.1.	Actividad de la enzima caspasa-3	193
3.1.9.1.1.	Modelo celular SH-SY5Y	194
3.1.9.1.2.	Modelo celular U373-MG	194
3.1.9.2.	Marcadores de apoptosis	195
3.1.9.2.1.	Modelo celular SH-SY5Y	196
3.1.9.2.2.	Modelo celular U373-MG	198
3.1.10.	Estudio del mecanismo de autofagia	200
3.1.10.1.	Modelo celular SH-SY5Y	200
3.2.	Estudios de barrera hematoencefálica (BHE)	203
3.2.1.	Propiedades moleculares de los metabolitos liquénicos	203
3.2.2.	Captación por células endoteliales	205
3.2.3.	Permeabilidad a través de BHE	208
3.3.	Potencial anticancerígeno	210
<b>4.</b>	<b>Estudio filogenómico del micobionte de <i>Cetraria islandica</i></b>	<b>213</b>
4.1.	Secuenciación y ensamblaje del genoma	213
4.1.1.	Cultivo del micobionte	213
4.1.2.	Análisis fitoquímico	214
4.1.3.	Secuenciación del genoma	215

4.1.4.	Ensamblaje de los <i>contigs</i> y <i>scaffolding</i>	216
4.2.	Predicción de genes biosintéticos	217
4.3.	Análisis de la filogenia de secuencias KS	220
<b>DISCUSIÓN</b>		<b>224</b>
<b>CONCLUSIONES / CONCLUSIONS</b>		<b>255</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>		<b>266</b>

## LISTADO DE ABREVIATURAS

<b>AAPH</b>	2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro
<b>Ac-DEVD-AMC</b>	[N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-AMP (7-amino-4-metilcumarina)]
<b>ACP</b>	Proteína transportadora acil-carrier
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNmt</b>	ADN mitocondrial
<b>AKT</b>	Proteína kinasa B
<b>ANOVA</b>	Análisis de la varianza
<b>AMC</b>	7-amino-4-metilcumarina
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARE</b>	Elemento de respuesta antioxidante
<b>AT</b>	Acil-transferasa
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>ATR</b>	Atranorina
<b>AUC</b>	Área bajo la curva
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>BHE</b>	Barrera hematoencefálica
<b>bFGF</b>	Factor básico de crecimiento de fibroblastos
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>COX</b>	Ciclooxigenasa
<b>DCF</b>	Diclorofluoresceína
<b>DCFH-DA</b>	Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína
<b>DE</b>	Desviación estándar
<b>DH</b>	Dehidratasa
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>ECL</b>	Electroquimioluminiscencia
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EGTA</b>	Ácido bis (2-aminoetil) etilenoglicol- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacético
<b>ELA</b>	Esclerosis lateral amiotrófica
<b>EO</b>	Estrés oxidativo
<b>ER</b>	Especies reactivas
<b>EnR</b>	Enoil-reductasa
<b>ERO</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>ERN</b>	Especies reactivas de nitrógeno
<b>ET</b>	Equivalentes de trolox
<b>EVE</b>	Ácido evérnico
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino
<b>FCCP</b>	Carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona
<b>FUM</b>	Ácido fumarprotocetrárico
<b>GLUT-1</b>	Transportador glucosa 1
<b>GPx</b>	Glutación peroxidasa
<b>GR</b>	Glutación reductasa
<b>GSH</b>	Glutación reducido
<b>GSSG</b>	Glutación oxidado
<b>GST</b>	Glutación-S-transferasas
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>HBSS</b>	Hank's Buffered Salt Solution
<b>HEPES</b>	Ácido <i>N</i> -(2-hidroxietil) piperacina- <i>N'</i> -2'-etanosulfónico
<b>4-HNE</b>	4-hidroxinonenal
<b>HO-1</b>	Hemooxigenasa-1
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta eficacia
<b>JNK</b>	Proteína quinasa del N-terminal de c-Jun



<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>KR</b>	Quetoreductasa
<b>KS</b>	Quetosintasa
<b>LDH</b>	Enzima lactato deshidrogenasa
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de baja densidad
<b>MAO</b>	Monoaminooxidasa
<b>MAPK</b>	Proteínas quinasas activadas por mitógeno p38
<b>MDA</b>	Malondialdehído
<b>α-MEM</b>	α-Minimum Essential Medium
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-ilo]-2,5-difeniltetrazol
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido
<b>NADPH</b>	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido
<b>NEM</b>	N-etilmaleimida
<b>NF-κB</b>	Factor nuclear kappa B
<b>NGF</b>	Factor de crecimiento nervioso
<b>NMDA</b>	N-Metil-D-Aspartato
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>cNOS</b>	Óxido nítrico sintasa constitutiva
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintasa inducible
<b>Nrf2</b>	Factor nuclear eritroide-2
<b>O<sub>2</sub>•-</b>	Radical superóxido
<b>O<sub>3</sub></b>	Ozono
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno singlete
<b>OH•</b>	Radical hidroxilo
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Peroxinitrito
<b>OPT</b>	Fluoróforo o-ptaldehído
<b>ORAC</b>	Capacidad de absorción del radical oxígeno
<b>P<sub>app</sub></b>	Permeabilidad aparente
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>p. ej.,</b>	Por ejemplo
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3-quinasa
<b>PKS</b>	Poliquétido sintasa
<b>PMM</b>	Potencial de membrana mitocondrial
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetanosulfonio
<b>PVDF</b>	Polifluoruro de vinilideno
<b>PVP</b>	Polivinilpirrolidona
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>RO•</b>	Radical alcóxido
<b>ROO•</b>	Radical peróxido
<b>ROOH</b>	Hidroperóxidos orgánicos
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SD</b>	Desviación estándar
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>SMILES</b>	Sistema Lineal Simplificado para Entrada Molecular
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>TBARS</b>	Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico
<b>TEER</b>	Resistencia eléctrica transendotelial
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
<b>TMRM</b>	Éster metílico de tetrametilrodamina
<b>TPSA</b>	Área topológica de la superficie polar
<b>TRIS</b>	Tris (hidroximetil) aminometano
<b>T<sub>R</sub></b>	Tiempo de retención
<b>USN</b>	Ácido úsnico
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>λ<sub>em</sub></b>	Longitud de onda de emisión
<b>λ<sub>exc</sub></b>	Longitud de onda de excitación

## RESUMEN

Tesis Doctoral: *Estudio con criterios filogenéticos del potencial neuroprotector de líquenes parmeliáceos. Mecanismo de acción de sus metabolitos secundarios.*

### Introducción

La ruptura del equilibrio que existe en condiciones fisiológicas entre especies pro-oxidantes (entre las que destacan las especies reactivas de oxígeno – ERO) y los sistemas antioxidantes provoca una situación de estrés oxidativo (EO) celular, que conlleva daño oxidativo a todas las biomoléculas, incluyendo proteínas, lípidos de membrana y ácidos nucleicos. Cuando el daño es excesivo o irreparable, se produce la muerte celular, generalmente por mecanismos de apoptosis. El EO afecta a todas las células del organismo, pero en especial medida, a las células del cerebro, que es un órgano especialmente susceptible al EO por sus características anatómicas y funcionales.

Así, una sólida evidencia científica apoya la implicación del EO, como causa y/o consecuencia, en la patogenia de diversas enfermedades neurodegenerativas, entre las que destacan la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson o la esclerosis lateral amiotrófica. Debido al incremento de la esperanza de vida y al envejecimiento paulatino de la población mundial, cada vez es mayor el impacto social y el coste sanitario de estos trastornos neurodegenerativos crónicos (asociados a la edad) que, además, carecen de tratamientos eficaces para prevenir, atenuar o retrasar la aparición de los característicos síntomas cognitivos o motores.

Actualmente, las estrategias farmacológicas con mayor respaldo científico para combatir las situaciones de EO celular y prevenir/atenuar el daño a biomoléculas consisten en el aporte exógeno de compuestos con propiedades antioxidantes. Éstos pueden actuar disminuyendo los niveles excesivos de ERO y de iones metálicos libres, así como potenciando el sistema antioxidante endógeno (enzimático y no enzimático). En este contexto, los compuestos de origen natural han sido objeto de numerosos estudios en los últimos años, mostrando algunos de ellos propiedades antioxidantes y neuroprotectoras muy interesantes. Se han estudiado mayoritariamente metabolitos secundarios de plantas superiores, la mayoría compuestos fenólicos, así como de hongos de vida libre. Sin embargo, poco se conoce sobre estas propiedades farmacológicas en los líquenes.

## Objetivos

Los resultados publicados en las dos últimas décadas, en que ha habido un interés renovado en el estudio de las actividades farmacológicas de líquenes, sugieren que estos organismos pueden ser fuentes interesantes de compuestos farmacológicamente activos. En base a ello y a las líneas de trabajo de nuestros grupos de investigación, el objetivo del presente trabajo se plantea como la evaluación del potencial neuroprotector, en base a las propiedades antioxidantes, de compuestos activos presentes en líquenes de la familia *Parmeliaceae* (la familia más numerosa de hongos liquenizados y con mayor interés farmacológico). En concreto, se persigue investigar el potencial neuroprotector de seis especies: *Cetraria islandica*, *Cetrelia braunsiana*, *Evernia prunastri*, *Parmotrema saccatilobum*, *Usnea ghattensis* y *Vulpicida canadensis*.

## Resultados y conclusiones

Se preparan inicialmente los extractos metanólicos de las seis especies y se evalúa su capacidad de captación de radicales libres por los ensayos de ORAC y DPPH, así como su contenido en polifenoles. Para evaluar su potencial neuroprotector, se utilizan las líneas celulares SH-SY5Y (modelo neuronal) y U373-MG (modelo de células de astrogliá), que se someten a una situación de estrés oxidativo por exposición a  $H_2O_2$  exógeno (0,1 mM para las células SH-SY5Y y 1 mM para las células U373-MG, 30 min). Se determinan, en un primer paso, las concentraciones de los extractos (en tratamientos de 24 h) que no afectan a la viabilidad de dichas células, utilizando los ensayos de reducción de MTT y actividad LDH. Y se evalúa posteriormente, mediante el ensayo de MTT, el efecto citoprotector de los extractos (pre-tratamiento de 24 h a las concentraciones no-citotóxicas, previo a la exposición a  $H_2O_2$ ) frente al EO, demostrando que los extractos presentan un potencial neuroprotector interesante. Además, mediante la medida de marcadores de EO, se investiga si ese efecto citoprotector es mediado por efectos antioxidantes intracelulares. Los extractos son capaces de mejorar el estado redox en ambos modelos celulares, protegiendo a las células de un aumento en la producción intracelular de ERO y en la peroxidación lipídica (reducen los niveles de MDA) y de alteraciones en el sistema antioxidante glutatión causadas por el  $H_2O_2$ . Los efectos más significativos son los demostrados por los extractos de *Evernia prunastri* y *Cetraria islandica*, sugiriendo la presencia de compuestos activos en su composición.

El análisis fitoquímico por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) permite identificar los metabolitos secundarios presentes en cada uno de los extractos. Se identifican el

ácido evérnico (EVE) y el ácido fumarprotocetrárico (FUM) como componentes mayoritarios de los extractos de *E. prunastri* y *C. islandica*, respectivamente. Debido a que son los extractos más activos, se procede al aislamiento de ambos compuestos por una técnica de HPLC semi-preparativa, confirmando la identidad y alta pureza de los productos aislados por comparación de espectros de absorción UV y de resonancia magnética nuclear  $^1\text{H}$ . Además de esos dos compuestos, se seleccionan la atranorina (ATR) y el ácido úsnico (USN), por estar presentes en proporciones variables en dos o más extractos. Por tanto, se continúa el estudio para profundizar en el potencial neuroprotector (y su mecanismo de acción) de los cuatro compuestos aislados: ATR, EVE, FUM y USN.

Del mismo modo que los extractos, los compuestos liquénicos aislados demuestran un efecto citoprotector frente a EO, aumentando la viabilidad celular en las líneas SH-SY5Y y U373-MG, respecto a las células sólo tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Se seleccionan las concentraciones de cada uno de los compuestos que ejercen una citoprotección óptima en cada modelo celular, que se encuentran en el rango de 1  $\mu\text{g/ml}$  a 25  $\mu\text{g/ml}$ . El pre-tratamiento (24 h) con los compuestos, previo a la exposición a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , atenúa los efectos perjudiciales sobre los cambios morfológicos y sobre los marcadores de EO: disminuye los niveles intracelulares de ERO y de MDA, así como evitan las alteraciones del ratio GSH/GSSG. En este sentido, esos resultados pueden explicarse por la capacidad de los compuestos para inducir la expresión de diversas enzimas antioxidantes (aumentando sus niveles proteicos). Se observa que dichos efectos están mediados, al menos en parte, por la activación de la expresión y translocación al núcleo del factor de transcripción Nrf2, que regula la expresión génica de las enzimas antioxidantes de fase II. Los efectos más prometedores son los ejercidos, en este orden, por EVE y FUM, mientras que ATR y USN ejercen un potencial antioxidante más moderado.

En la fisiopatología de los trastornos neurodegenerativos existe, además, una estrecha relación entre el EO y la disfunción mitocondrial a nivel de neurona y astrogliá. Por ello, se evalúan en el presente trabajo diversos marcadores de disfunción mitocondrial, así como de la apoptosis (directamente relacionada con la anterior). Los resultados señalan que los compuestos liquénicos (a las concentraciones óptimas) protegen frente a la disfunción mitocondrial debida al EO inducido por  $\text{H}_2\text{O}_2$ , en ambos modelos celulares. De hecho, son capaces de evitar la pérdida de potencial de membrana mitocondrial y atenuar las alteraciones en los niveles de calcio mitocondrial y citosólico. Estas acciones, junto a las anteriormente indicadas, resultan en un efecto anti-apoptótico de los compuestos liquénicos en el modelo de neurona y de astrocito: inhiben la actividad de la enzima caspasa-3 y reducen los niveles

proteicos de su forma activa, y también modulan la expresión de factores proteicos reguladores de la apoptosis, disminuyendo los niveles de BAX (pro-apoptótico) y aumentando los de Bcl-2 (anti-apoptótico). De nuevo, EVE y FUM muestran los efectos más significativos. Además, se demuestra que estos dos compuestos actúan como potentes activadores del flujo de autofagia en el modelo de células neuronales, lo que sugiere que ejercen su efecto neuroprotector mediante acciones a distintos niveles.

Por otra parte, para completar el estudio, se ha evaluado si los cuatro compuestos líquénicos son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), como requisito indispensable para cualquier compuesto dirigido a ejercer su acción protectora sobre el daño oxidativo a nivel cerebral. Los ensayos *in vitro* realizados han permitido demostrar que los compuestos líquénicos presentan capacidades variables para difundir a través de la BHE, que están directamente relacionadas con sus propiedades moleculares, tales como el tamaño (peso molecular) y la lipofilia. Se encuentra que el ácido evérnico es, de los cuatro compuestos evaluados, el que tiene una mayor capacidad de permear a través de las células endoteliales de los capilares cerebrales.

Finalmente, se ha llevado a cabo un estudio genómico a fin de identificar los genes responsables de la síntesis del ácido fumarprotocetrárico por el líquen *Cetraria islandica*; este estudio supone la utilización de muy variadas herramientas bioinformáticas. Tras el desarrollo del cultivo del micobionte aislado, se extrae y secuencía su ADN genómico para obtener posteriormente el ensamblaje de su genoma. Una vez obtenido un genoma de calidad adecuada, se predicen en él los genes biosintéticos, con especial interés en los genes que codifican para las poliquétido sintasas (PKS), principales enzimas involucradas en la biosíntesis de poliquétidos líquénicos. Los resultados permiten identificar un único gen PKS candidato que cumple los requisitos mínimos para ser el responsable de la síntesis del FUM (principal metabolito con potencial neuroprotector en *C. islandica*).

## SUMMARY

PhD thesis: *Study with phylogenetic criteria of the neuroprotective potential of Parmeliaceae lichens. Mechanism of action of their secondary metabolites.*

### Introduction

Excessive levels of pro-oxidant species (namely, reactive oxygen species - ROS) in comparison to antioxidant systems may lead to the disruption of physiological redox homeostasis; this situation is called oxidative stress (OS). It provokes oxidative damage in biomolecules, including proteins, membrane lipids and nucleic acids. When cell damage is irreparable, it eventually leads to cell death, which normally occurs through the mechanism of apoptosis. Oxidative stress affects all cell types in the organism, but brain is especially sensitive to its noxious effects due to the peculiar anatomic and functional characteristics of that tissue.

Furthermore, there are consistent scientific evidences that support the involvement of OS as a causal and/or consequential factor in the physiopathology of several neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis. The increase in life expectancy and the subsequent gradual ageing of the world population explain the remarkable and growing impact on society and the sanitary costs of these chronic neurodegenerative disorders (that are closely associated to ageing). Besides, these diseases lack effective treatments that prevent, attenuate or delay the onset of the specific cognitive and motor symptoms.

Nowadays, the exogenous administration of compounds with antioxidant properties is the most accepted pharmacological strategy to counteract the situation of cellular OS, in order to prevent or attenuate the damage to biomolecules. Antioxidant compounds may act by diminishing the excessive intracellular ROS levels, and metal ions levels, as well as by enhancing the endogenous antioxidant systems (both enzymatic and non-enzymatic ones). In this context, natural compounds have been the issue of numerous studies in the last decades. Some compounds have shown very interesting antioxidant and neuroprotective properties; among them, one may highlight the secondary metabolites of higher plants and free-living fungi, mostly phenolic compounds. However, little is known with this respect on the pharmacological potential of lichens.

---

## Objectives

In the last two decades, there has been a renewed interest in the pharmacological properties of lichens, with promising results suggesting that lichens arise as natural sources of active compounds. Based on these findings and the lines of investigation of our research groups, the present work aims at evaluating for the first time the neuroprotective potential (related to antioxidant properties) of active metabolites present in lichens from *Parmeliaceae* family, the most numerous and pharmacologically interesting family of lichen-forming fungi. In particular, we will focus on the neuroprotective potential of six species: *Cetraria islandica*, *Cetrelia braunsiana*, *Evernia prunastri*, *Parmotrema saccatilobum*, *Usnea ghattensis* and *Vulpicida canadensis*.

## Results and conclusions

We initially evaluated the antioxidant activities of the methanol extracts of the six specimens by measuring their capacities to scavenge free radicals in ORAC and DPPH assays, as well as their contents in polyphenols. Furthermore, in order to investigate the neuroprotective potential against oxidative damage, we used the central nervous system (CNS)-derived cell lines SH-SY5Y (neuronal model) and U373-MG (model of astroglia), which were subjected to the induction of OS through the exposure to exogenous  $H_2O_2$  (30 min, 0,1 mM and 1 mM for SH-SY5Y and U373-MG cell lines, respectively). The non-cytotoxic concentrations of the different extracts were initially determined by the MTT reduction and the LDH activity assays, and then tested for cytoprotection against  $H_2O_2$  (through the MTT reduction assay). The pre-treatments (24 h) with the extracts, prior to OS induction, displayed significant cytoprotective effects in comparison to  $H_2O_2$ -treated cells. The optimal cytoprotective concentrations of each extract (on each cell model) were selected at this point and further assessed for their effects on OS markers. In comparison to  $H_2O_2$ -treated cells, lichen extracts were capable to ameliorate redox status in both cellular models: they attenuated intracellular ROS generation, diminished lipid peroxidation (resulting in lower MDA levels) and prevented from alterations in antioxidant glutathione system; such actions resulted in the reversion of cell morphology changes. It was therefore demonstrated that the cytoprotective effects of lichen extracts were mediated, at least in part, by their antioxidant activities. The most effective cytoprotection against OS was shown by the methanol extracts of *Evernia prunastri* and *Cetaria islandica*; these results imply the presence of active compounds in their composition.

The phytochemical analysis by high performance liquid chromatography (HPLC) allowed the identification of the major secondary metabolites present in the extracts. Evernic acid (EVE) and fumarprotocetraric acid (FUM) were identified as the most abundant constituents in *E. prunastri* and *C. islandica* methanol extracts, respectively. Since those extracts were the most active in the previous assays, we proceeded with the isolation of both compounds by a semi-preparative HPLC technique. Afterwards, the identity and purity of both isolated compounds were confirmed by comparing their UV spectra and the  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance spectra. In addition, we also selected atranorin (ATR) and usnic acid (USN) because of their presence in two or more extracts. Thus, the study will continue with the four isolated compounds (ATR, EVE, FUM, and USN) for deepening in the study of their neuroprotective potential and mechanisms of action.

As it was previously demonstrated for the extracts, the four isolated lichen compounds showed significant cytoprotective effects against OS, thus enhancing cell viability in SH-SY5Y and U373-MG cell lines, compared to  $\text{H}_2\text{O}_2$ -treated cells. We selected the concentrations of the compounds showing the maximum cytoprotective effects in each cell model, which were in the range between 1 and 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Pre-treatments with lichen compounds (24 h), prior to  $\text{H}_2\text{O}_2$  exposure, alleviates the harmful effects of oxidative damage on cell morphology, and on biochemical markers: they reduce intracellular ROS production and MDA levels, and prevent from the alterations in GSH/GSSG ratio. Such results may be explained by the capacity of lichens compounds to induce the expression of several antioxidant enzymes, since higher protein levels were found by immunoblot techniques. Our findings also point to the activation of Nrf2 signaling pathway as the intracellular mechanism underlying the cytoprotective and antioxidant actions mediated by lichen compounds. Following treatments with test compounds, we found an increased translocation to nucleus and higher DNA binding activity for Nrf2 factor, which modulates transcription of phase-II cytoprotective enzymes genes. With this regard, EVE and FUM showed, in this order, the most promising effects, while ATR and USN displayed more moderate antioxidant activities.

In the physiopathology of neurodegenerative disorders, there is also a direct relationship between OS and mitochondrial dysfunction in neurons and astrocytes. Therefore, in the present study we also evaluated several markers of mitochondrial dysfunction and the closely related apoptosis. Results indicate that lichen compounds (pre-treatments at optimal concentrations) protect against the mitochondrial failure due to  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced OS. In fact, they are able to significantly prevent CNS-derived cells from mitochondrial membrane potential dissipation, and to attenuate the alterations in mitochondrial and cytosolic calcium levels.



Those actions, together with the previously demonstrated antioxidant mechanism, result in an anti-apoptotic effect in the neurons and astrocytes models. Lichen compounds inhibited caspase-3 activity and reduced the protein levels of the active enzyme, as well as modulated the expression of apoptotic regulating factors: decrease in the protein levels of BAX (pro-apoptotic) and increase in Bcl-2 expression (anti-apoptotic). Regarding mitochondria-mediated effects, the most active compounds were again EVE and FUM. Moreover, these two compounds have been shown to act as potent activators of autophagy flux in the neuronal cell model. All in all, our results suggest that they mediate a neuroprotective effect by acting at different levels.

On the other hand, in order to complete the research on their neuroprotective properties, we evaluated the capacity of lichen compounds to cross the blood-brain barrier (BBB), as it is a crucial requisite for all active compounds displaying their protective effects in the CNS. The *in vitro* studies conducted herein demonstrated that lichen compounds present diverse capacities to permeate through the BBB via passive mechanism (transcellular pathway), which are directly linked to their molecular properties, such as molecular weight and lipophilicity. We found that, among the four compounds investigated in this work, evernic acid shows the highest capacity to diffuse through the endothelial cell layer of the brain microvessels.

Finally, we developed a genomic study aimed at identifying the genes responsible for the synthesis of fumarprotocetraric acid in *Cetraria islandica*; such study involves the use of diverse bioinformatic tools. After developing the pure culture of the isolated mycobiont from *Cetraria islandica*, we extracted and then sequenced its genomic DNA. Once the *de novo* assembled genome was obtained, the biosynthetic genes were predicted on it. We specially focused on the genes encoding for the polyketide synthases, the main enzymes involved in the biosynthesis of lichen polyketides. Results of this study allowed the identification of one putative PKS gene which meets the minimum requirements and could be considered the most likely candidate to encode for the PKS enzyme responsible for the fumarprotocetraric acid synthesis (potential neuroprotective agent in *C. islandica*).

# **INTRODUCCIÓN – REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

-----

# 1. LÍQUENES

## 1.1. Introducción

### 1.1.1. Características generales

De forma general, puede afirmarse que los líquenes son organismos compuestos por un hongo y un alga y/o cianobacteria. No se trata de organismos individuales sino de una simbiosis que funciona en la naturaleza como una unidad, y en la que los tejidos del hongo (micobionte) generalmente rodean al alga y/o la cianobacteria fotosintética (fotobiontes). Existe una amplia variabilidad en las relaciones que se establecen entre el hongo y el alga (o cianobacteria), ya que pueden existir dos, tres, cuatro o incluso más simbiontes en el mismo organismo; por ello, ha habido un intenso debate en torno a la definición de “liquen” (Hawksworth, 1988; Nash, 1996; Grube y Hawksworth, 2007). Se acepta como definición de consenso la facilitada por Hawksworth y Honegger (1994), según la cual los líquenes son *“ecologically obligate, stable mutualism between an exhabitant fungal partner (the mycobiont) and an inhabitant population of extracellularly located unicellular or filamentous algal and/or cyanobacterial cells (the photobiont)”* (Kirk y col., 2011).

La relación establecida en la interacción entre el hongo (heterótrofo) y el alga (autótrofo) es lo que determina el tipo de desarrollo del talo liquénico (holobionte) que, aunque con diversos matices, puede darse de tres formas principales: en forma de hoja (foliáceo), en forma de costra (crustáceo) o en forma de pequeño arbusto (fruticuloso). Dentro del talo (Figura 1), la parte fúngica exohabitante suele ser mayoritaria y genera una estructura que confiere soporte y protección al alga o cianobacteria endohabitante que es, a su vez, la encargada de realizar la fotosíntesis y aportar los nutrientes necesarios para el desarrollo de ambos (Nash, 1996; Honegger, 1998). Además, diversas investigaciones confirman la presencia de una variedad de bacterias no fotosintéticas y extracelulares que viven en asociación con los líquenes y que actúan en la solubilización de sales (fosfatos), como fijadoras de nitrógeno o productoras de ciertos metabolitos bioactivos; aún se requiere mayor conocimiento sobre el papel que juega la presencia de éstas en la simbiosis liquénica y en el desarrollo del talo (Cardinale y col., 2006; Liba y col., 2006; Cernava y col., 2016).

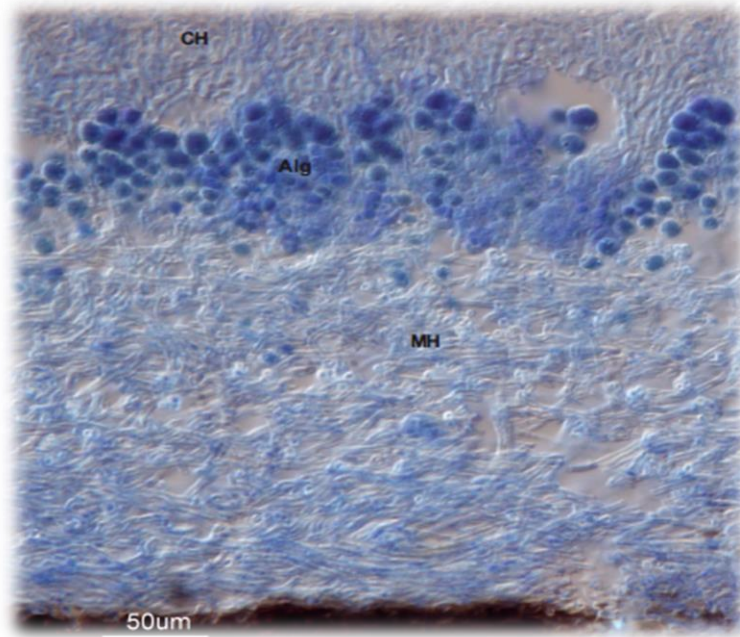


Figura 1. Sección transversal de un talo líquénico tipo. Se observa cómo las células del alga (Alg) quedan en una capa intermedia rodeadas por las hifas medulares internas (MH) y corticales más externas (CH) del hongo.

El hongo es el organismo que domina la simbiosis, y la liquenización puede entenderse como una estrategia nutricional de los hongos para obtener nutrientes. En torno al 20% de los hongos forman simbiosis líquénicas (Lutzoni y col., 2001). Más del 98% de los hongos liquenizados pertenecen a la división *Ascomycota* y sólo unos pocos órdenes corresponden a la división *Basidiomycota* y *Deuteromycota*. Además, la mayoría de los hongos liquenizados (micobiontes) forma simbiosis con algas verdes unicelulares, sólo un 10% de ellos con cianobacterias y un 3% con ambas (Oksanen, 2006). Algunos micobiontes pueden incluso cambiar su compañero fotosintético de alga verde a cianobacteria, o viceversa, como consecuencia de una adaptación ecológica, que conlleva cambios en la morfología del talo (Honegger, 1996). Aunque se han descrito unos 40 diferentes, los géneros de algas *Trebouxia* y *Trentepohlia* son los más comúnmente presentes en líquenes, mientras que el género *Nostoc* es el más frecuente entre las cianobacterias (Tschermak-Woess, 1988; Nash, 1996; Hawksworth, 2015).

La simbiosis líquénica aporta a sus miembros características que no presentarían si estuvieran aislados; de hecho, la gran mayoría de especies de hongos y algas que se asocian en la formación de líquenes no tienen formas de vida libre. Desde el punto de vista evolutivo, esta asociación resulta muy exitosa y ha permitido a las especies líquénicas colonizar ecosistemas muy diversos y con condiciones climatológicas extremas, en parte debido a sus propiedades de poiquilohidria y poiquilotermia. La elevada resistencia a factores externos les permite habitar

hasta el 8% de los ecosistemas distribuidos por toda la superficie terrestre, desde desiertos cálidos a bosques tropicales o núcleos urbanos, desarrollándose en cortezas de árboles, superficies de rocas o en la biomasa del suelo. Dominan ecosistemas como las regiones polares y ambientes alpinos donde las plantas vasculares no pueden desarrollarse (Ahmadjian, 1993; Brodo y col., 2001; Asplund y Wardle, 2016).

A pesar de encontrarse en muchos casos en ambientes con condiciones adversas, los líquenes tienen la capacidad de reproducirse sexualmente mediante ascosporas (sólo el micobionte) o asexualmente mediante diasporas (tanto micobionte como fotobionte), las cuales son mayoritariamente isidios o soledios (Seymour y col., 2005). En general, los líquenes son organismos de crecimiento muy lento (en ciertos casos crecen incluso menos de 1 mm al año) y algunos se incluyen entre los seres vivos más longevos de la tierra, alcanzando hasta los 1000 años. En condiciones ambientales muy extremas, son capaces de perder hasta el 95 % de su contenido en agua y entrar en un estado reversible de latencia que les permite resistir durante mucho tiempo, rehidratándose y recuperando su actividad metabólica cuando las condiciones son más óptimas (Beschel, 1961; Kranner y col., 2008; Ellis, 2012).

Esta resistencia frente a condiciones adversas de temperatura, humedad, etc., contrasta con su elevada sensibilidad a los contaminantes ambientales. Los líquenes, por carecer de cutícula protectora, absorben los minerales presentes en el agua de lluvia; así, la presencia en ella de óxidos metálicos, especialmente el dióxido de azufre (en elevada concentración en la “lluvia ácida”), influye en el crecimiento, distribución y salud de los líquenes. No obstante, esto no es general, ya que algunas especies crecen en superficies que contienen elevadas concentraciones de metales y se adaptan a ellos, desarrollando resistencia contra contaminantes concretos. Éstas y otras propiedades (como su longevidad) han favorecido que los líquenes sean ampliamente utilizados como bioindicadores de la calidad del aire ambiental en numerosos estudios que emplean métodos como la cuantificación de las poblaciones líquénicas, exámenes de su morfología y el análisis de metales pesados en talos naturales o trasplantados (Conti y Cecchetti, 2001; Hawksworth y col., 2005).

### 1.1.2. Clasificación taxonómica

Los líquenes no están considerados como un grupo taxonómico propio, sino que su taxonomía se basa en la clasificación del componente fúngico dominante o micobionte. Por tanto, y a pesar de que pueden incluir individuos de tres reinos distintos, las simbiosis líquénicas pertenecen, desde un punto de vista taxonómico y filogenético, al reino *Fungi*. A día de hoy, la clasificación de los hongos formadores de líquenes o liquenizantes se encuentra bien integrada en la clasificación del resto de especies de hongos. La clase ***Lecanoromycetes***, dentro de la división ***Ascomycota***, es la que concentra a la gran mayoría de micosimbiontes conocidos (Hibbet y col., 2007).

Desde el punto de vista de su sistemática, los líquenes no constituyen un grupo homogéneo debido, principalmente, a que no tienen un mismo origen. Se cree que la liquenización no es una característica monofilética, sino más bien una convergencia adaptativa desarrollada independientemente por organismos de distintas líneas evolutivas (polifilesis) (Gargas y col., 1995). Se estima, además, que en la evolución de los líquenes ascomicetos el proceso de liquenización ha ocurrido hasta en cinco ocasiones, de forma que los micobiontes han superado varios eventos de adquisición y pérdida de la capacidad de liquenizar (Schoch y col., 2009).

En los últimos años, la inclusión de estudios genéticos en este campo (como el anteriormente citado de Schoch y col.) ofrece una investigación más profunda sobre los vínculos existentes y ha generado un intenso debate científico en torno a la clasificación de las familias y especies líquénicas, con continuos cambios en cuanto a la posición filogenética de muchas de ellas (Lumbsch y Huhndorf, 2007). Así pues, serán sin duda los resultados derivados del estudio con criterios genéticos los que permitan confirmar el origen polifilético o identificar cierto origen común de estos organismos.

Se estima que existen entre 18000 y 20000 especies de líquenes descritas. Sin embargo, la introducción de la filogenia molecular en el estudio de hongos liquenizados ha supuesto cambios conceptuales relevantes que afectan a aspectos relacionados con la delimitación de especies (Lumbsch, 1998; Feuerer y Hawksworth, 2007; Lumbsch y Huhndorf, 2010; Kirk y col., 2011). La clasificación de especies mediante el concepto morfológico clásico (que incluye también datos sobre la química de las especies) ha sido puesta en tela de juicio. Los datos moleculares han verificado en muchos casos las hipótesis tradicionalmente aceptadas en relación a las especies descritas, pero en otros muchos han generado conflictos con el

concepto morfológico aún en uso (Printzen, 2009; Lumbsch y Leavitt, 2011). En este sentido, el enfoque basado en el fenotipo para el reconocimiento de las especies subestima enormemente el número de especies realmente existentes, lo cual se debe, en parte, al descubrimiento de las llamadas especies crípticas (dos o más linajes independientes que exhiben o aparentan una morfología similar) (Crespo y Pérez-Ortega, 2009).

### **1.1.3. Código de barras molecular**

Entre las herramientas más recientes para el estudio molecular de los hongos, destaca principalmente el “*meta-barcoding*” o “**código de barras molecular**”, que permite la identificación de un espécimen hasta el nivel de especie y el descubrimiento de la diversidad taxonómica. Esta técnica se basa en la comparación de cierta secuencia genética en una muestra biológica, correspondiente a determinados *loci*, con las bases de datos existentes. Para ello, se desarrolla la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa, con la transcriptasa inversa en caso de ARN) mediante el uso de cebadores o *primers* específicos que permitan amplificar la secuencia objetivo en el ADN o ARN (previamente extraído) de la muestra problema. Para estudios de filogenia y taxonomía en hongos, se han utilizado ciertas secuencias genéticas como posibles marcadores moleculares, entre las que cabe destacar (Crespo y col., 2010b; Raja y col., 2011; Tretter y col., 2013; Renner, 2016):

- MCM-7: factor proteico esencial para la replicación del ADN.
- ITS: *internal transcriber spacer*.
- LSU RNAr: subunidad grande del RNA ribosomal.
- SSU RNAr: subunidad pequeña del RNA ribosomal.
- Gen codificante para la proteína RPB1.
- MS277: corresponde al gen de la proteína TSR1, de biogénesis ribosomal.

Los productos resultantes de la PCR se secuencian posteriormente, y la secuencia de ADN obtenida se utiliza para comparar con las bases de datos de ADN existentes. La coincidencia de la secuencia problema con otra presente en las bases de datos permite la identificación de la muestra biológica a nivel de especie. Sin embargo, algunos códigos de barras para ciertas especies serán completamente nuevos (por no estar presentes en ninguna base de datos), en cuyo caso la identificación puede recaer sobre la situación de la especie nueva junto a cierta especie próxima en un árbol filogenético. Entre las bases de datos de ADN de referencia, cabe destacar para hongos: GenBank (base de datos de secuencias genéticas del

National Institute of Health's de Estados Unidos, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), UNITE (<https://unite.ut.ee/>) y RDP Classifier (<https://rdp.cme.msu.edu/classifier/>) (Das y Deb, 2015; Yahr y col., 2016).

En hongos en general, y en líquenes en particular, existe cierto consenso sobre la utilización del **ITS** (*internal transcribed spacer region*, dentro del ADN nuclear ribosomal) como el marcador o “código de barras” genético más eficaz para identificación taxonómica de una muestra y para estudios filogenéticos (Schoch y col., 2012). Presenta como principal ventaja frente a otros marcadores la sensibilidad y universalidad de los *primers*; por ello, se encuentran disponibles en GenBank hasta 172.000 secuencias completas de ITS de hongos. Sin embargo, sólo una minoría de líquenes han sido hasta ahora analizados para identificar su ITS; por ejemplo, en el orden más numeroso de hongos formadores de líquenes (*Lecanorales*), que comprende alrededor de 5700 especies, sólo un 30% de todas ellas tienen su secuencia ITS publicada en GenBank (Kelly y col., 2011; Mark y col., 2016).

Ésta es una de las líneas de investigación más importantes a seguir en la investigación de la taxonomía de líquenes. Los futuros estudios filogenéticos con criterios moleculares modificarán el número y nombre de algunas especies descritas, como ha ocurrido recientemente con la descripción de numerosas especies nuevas (Lumbsch y col., 2011).



## 1.2. La familia *Parmeliaceae*

### 1.2.1. Descripción taxonómica y botánica

La familia *Parmeliaceae* constituye la familia más numerosa de hongos liquenizados. Agrupa en torno a 2700 especies (aproximadamente un 10 % del total de especies conocidas) diferentes que se distribuyen en unos 80 géneros, e incluye a muchos de los grupos de líquenes más comúnmente conocidos, tales como los “líquenes barba” (*Usnea* sp.) o los “líquenes escudo” (*Parmelia* sp.) (Lumbsch and Huhndorf, 2010).

La clasificación taxonómica de la familia *Parmeliaceae* se resume en la Tabla 1.

<b>Dominio</b>	<i>Eukarya</i>
<b>Reino</b>	<i>Fungi</i>
<b>División</b>	<i>Ascomycota</i>
<b>Clase</b>	<i>Lecanoromycetes</i>
<b>Orden</b>	<i>Lecanorales</i>
<b>Familia</b>	<i>Parmeliaceae</i>

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la familia *Parmeliaceae*.

*Parmeliaceae* es una de las familias de líquenes más recientes, ya que su origen data de alrededor del Cretáceo tardío (hace aprox. 108 millones de años). Dentro de la familia, la mayoría de linajes evolucionaron durante el Eoceno, Oligoceno, Mioceno y Plioceno temprano. Algunos eventos paleoclimáticos tales como la edad de hielo, las glaciaciones del Mioceno/Oligoceno y la formación de cordilleras se han señalado como causas de la diversificación de los linajes. Parmelioide, el grupo morfológico mayoritario en la familia, se diversificó alrededor del límite entre el Cretáceo y el Terciario (hace aprox. 60 millones de años) (De Paz y col., 2011; Divakar y col., 2012; Leavitt y col., 2013).

De forma general, se considera que las especies de esta familia se distinguen por presentar talos tetra-estratificados que pueden ser foliáceos (p. ej., *Parmelia* sp.), fruticulosos (p. ej., *Pseudevernia* sp.), o subfruticulosos filamentosos (p. ej., *Cetraria* sp.), pero también pueden encontrarse talos peltados, umbilicados, subcrustáceos (p. ej., *Xanthoparmelia* sp.). Presentan un córtex superior formado por pseudoparénquima de hifas fúngicas y un córtex inferior similar pero con estructuras tipo rizomas para la unión al sustrato. Sobre el córtex inferior se encuentra la médula formada por hifas del hongo empaquetadas y sobre ella la

capa del fotobionte, que suele ser un alga unicelular esferoidal, mayoritariamente del género *Trebouxia*. Los colores de estos líquenes pueden variar entre gris y amarillo-verdoso, con el córtex superior del talo de un color marrón a verde-marrón. Los líquenes parmeliáceos pueden reproducirse asexualmente por isidios, soredios y propágulos; respecto a la reproducción sexual por esporas, suelen presentar apotecios sencillos (con parafisos en su interior y ascas hialinas con estructura cupular en su extremo, productoras de 8 ascosporas) y picnidios de tipo baciliforme, filiforme o bifusiforme. En general, la estructura de los apotecios ha sido el criterio morfológico más importante para delimitar la familia (Thell y col., 2012).

En comparación con otras familias, *Parmeliaceae* ha sido profundamente estudiada desde un punto de vista de su sistemática y filogenia, pero son pocos los estudios exhaustivos de las propiedades farmacológicas de sus especies. Detallaremos este punto más adelante, por constituir uno de los ejes principales del presente trabajo.

### **1.2.2. Distribución geográfica**

La familia *Parmeliaceae* se encuentra ampliamente distribuida por toda la superficie de la Tierra. Las especies liquénicas de esta familia son primitivamente características del hemisferio sur, con una distribución basada en el sur de África, América del Sur y Australia. Pero también aparecen en zonas templadas, boreales, sub-alpinas y mediterráneas del hemisferio norte, por lo que es difícil delimitar la distribución geográfica de esta familia a una zona concreta (Figura 2) (Thell y col., 2012).

Además, la circunscripción de ciertos géneros resulta ser problemática, ya que se están descubriendo aún nuevas especies, principalmente en los trópicos, incluso en grupos que se consideraban bien investigados.



Figura 2. Ampla distribución geográfica de los líquenes parmeliáceos. Con una distribución originalmente mayoritaria en el hemisferio sur (en rojo), también se extienden por distintas regiones del hemisferio norte (en negro).

### 1.2.3. Filogenia de la familia

Tras más de dos siglos de investigación taxonómica y continuos cambios, que se aceleraron en la década de 1960, la sistemática de *Parmeliaceae* se está estabilizando gradualmente con la introducción de los estudios moleculares de ADN y de la filogenómica. A lo largo de las últimas dos décadas se ha llevado a cabo la reevaluación taxonómica de los géneros parmeliáceos, utilizando como base las hipótesis filogenéticas inferidas a partir de los análisis moleculares (Divakar y col., 2006, Wirtz y col., 2006, Crespo y col. 2010b, De Paz y col., 2010a). Como ejemplo de los cambios introducidos, cabe destacar que la familia *Parmeliaceae*, tal y como se definió originalmente por Eschweiler (1824), comprendía 6 géneros de los que actualmente se conoce que tienen una relación filogenética muy distante. De ellos, sólo *Parmelia* y *Cornicularia* pertenecen a *Parmeliaceae* en su concepto taxonómico actual y el originario género *Parmelia* se ha dividido en 32 géneros diferentes. Incluso, recientemente se ha estimado la existencia de hasta 80 linajes crípticos que permanecían escondidos bajo el nombre de otras especies dentro de la misma familia (Crespo y Lumbsch, 2010). La distribución de los caracteres morfológicos, químicos y ecológicos empleados tradicionalmente en la sistemática de los líquenes parmeliáceos no refleja la topología subfamiliar reconstruida con los datos moleculares.

Actualmente, se considera que *Parmeliaceae* constituye un gran grupo monofilético bien respaldado, compuesto, a su vez, por siete linajes monofiléticos independientes que representan diferentes grupos morfológicos: alectorioide, cetrarioide, hipogimnioide, letharioide, parmelioides, psiloparmelioides y usneoide. Algunos de estos linajes equivalen a lo que se habría considerado previamente como familias separadas (p. ej., *Alectoriaceae*, *Anziaceae*, *Cetrariaceae*, *Corniculariaceae*, *Everniaceae*, *Hypogymniaceae*, *Parmeliaceae* y *Usneaceae*) (Eriksson y Hawksworth, 1998; Thell y col., 2012). De ellos, 4 clados podrían destacarse por comprender el mayor número de especies: alectorioide, cetrarioide, parmelioides y usneoide. Éstos se clasificaron inicialmente de acuerdo a la apariencia del talo liquénico (Crespo y col., 2007):

- Los líquenes cetrarioides presentan un talo folioso, erecto, con apotecios marginales y picnidios.
- Los líquenes alectoroides son fruticulosos, a menudo con “forma de barba”, colgante o creciente en racimos o mechones.
- Las especies del clado parmelioides son principalmente foliosos, generalmente anclados al sustrato y poseen apotecios laminales y picnidios.

- En el clado usneoide se incluye un grupo heterogéneo de líquenes fruticulosos y que crecen en forma de hebra o similar.

Crespo y colaboradores (2010b) presentaron una síntesis de la filogenia de *Parmeliaceae*, reconstruyéndola con criterios moleculares y con especial atención a los géneros dentro del **grupo parmelioides**, por ser el más numeroso (aprox. 1800 especies) y con carácter monofilético contrastado; de hecho, es el grupo monofilético más extenso que se conoce en líquenes. Dentro de él, se describen 27 géneros organizados en nueve clados monofiléticos principales, mono o poligenéricos, que son: *Cetrelia*, *Hyoptrachyna*, *Melanohalea*, *Nipponoparmelia*, *Parmelia*, *Parmelina*, *Parmeliopsis*, *Parmotrema* y *Xanthoparmelia*. La relación entre los géneros dentro de cada clado parece resuelta, pero no ocurre lo mismo en la relación entre los nueve clados principales. Para resolverla, se requerirá la inclusión de más *loci* en los análisis filogenéticos y la inclusión de nuevos caracteres con valor taxonómico y filogenético, como los órganos y genes de reproducción sexual.

El **grupo cetrarioide** es un grupo morfológico polifilético que incluye aproximadamente 150 especies de líquenes distribuidas en 25 géneros, y todas ellas con apotecios y picnidios marginales. Sin embargo, el clado cetrarioide identificado en la filogenia de *Parmeliaceae* contiene unas 97 especies distribuidas en 17 géneros (es el segundo clado más abundante por número de géneros), ya que algunos géneros y especies con morfología cetrarioide se posicionan fuera del clado, como el género *Cetrelia* que pertenece al clado parmelioides. Dentro de las subdivisiones del clado cetrarioide, destaca el clado *Cetraria*, que incluye al género *Cetraria* como el más característico y que da nombre al grupo. Además, encontramos el clado *Nephromopsis* y el clado que contiene a los géneros *Dactylina*, *Esslingeriana* y *Melanelia*, que divergieron en etapas tempranas de la evolución y se separan de los otros dos clados principales (Thell y col., 2009; Xu et al., 2016).

Los otros clados filogenéticos de la familia son (Thell y col., 2012):

- Clado usneoide: contiene numerosas especies (aproximadamente 350) pero agrupadas en el único género del clado (*Usnea*).
- Clado hipogimnioide: es un clado con débil resolución, por estar menos investigado que otros, y que incluye 4 géneros.
- Clado alectorioide: incluye 5 géneros de líquenes fruticulosos, con 66 especies en total.
- Los clados pequeños: letharioide y psiloparmelioides, con sólo dos géneros y menos de 20 especies cada uno.

Además, se incluyen en *Parmeliaceae* varios géneros con afinidad incierta que se presentan como clados individuales, como es el caso de *Evernia*, *Menegazzia*, *Cornicularia* y *Oropogon*, entre otros. Esto puede deberse a limitaciones en los trabajos filogenéticos desarrollados, y una más profunda investigación permitirá elucidar las relaciones filogenéticas de estos géneros.

#### **1.2.4. Especies incluidas en el trabajo**

Las seis especies de líquenes parmeliáceos (Figura 3) que se incluyen en el presente trabajo se encuadran en distintos clados filogenéticos, tal y como se detalla en la Figura 4. Las características principales de dichas especies son las siguientes:

- ***Cetraria islandica*** (L) Ach.: presenta un talo fruticuloso acintado y cóncavo en el haz, de unos 10-15 cm de longitud, con ramificaciones irregulares (0,3-1,5 cm de ancho y 0,5 mm de grosor) que son acanaladas y dentadas; los apotecios aparecen en los extremos de los lóbulos en forma de discos de color rojizo-marrón; talo de color verde olivo-marrón en la parte superior y en la parte inferior presenta un color blanco-grisáceo, con manchas anaranjadas en la base. Crece en áreas árticas y sub-árticas, Europa del norte y del este, Siberia y Norte América, y en zonas montañosas de Europa Central. Normalmente, crece en el suelo. Además de diversos polisacáridos (entre los que destacan el liquenano e isoliquenano), presenta ácido fumarprotocetrárico, ácido protocetrárico, ácido protoliquesterínico y ácido úsnico (trazas) (monografía de la OMS, 2004).
- ***Cetrelia braunsiana*** (Müll. Arg.) W.L. Culb. & C.F. Culb.: presenta un talo folioso mediano-grande (entre 5 y 17 cm de ancho), con lóbulos de 0,5-0,7 cm de ancho; isidios granulares o coraloides con distinto grado de desarrollo a lo largo de los márgenes o en la parte superior externa, la cual es de color verde-grisáceo (más marrón en especímenes antiguos de herbario); es pseudociliado, con poros pequeños de forma variable, pero rara vez miden más de 1 mm; la parte inferior del talo es negra con los márgenes marrones o verde-grisáceos, presenta rizomas negros de aprox. 1 mm; no se ven apotecios y los picnidios sólo están presentes en algunos especímenes; limitados tipos de isidios. Habita en altitudes de entre 500 y 1700 m y se suele encontrar sobre troncos de especies de *Abies*, *Pinus* y *Quercus*, a veces también sobre rocas. Crece mayoritariamente en el este de Asia (sobre todo en Corea y Japón). Contiene atranorina, ácido alectorónico, ácido  $\alpha$ -colatólico, ácido 4-o-metil-fisódico y ácido fisódico (Luo y col., 2007).

- ***Evernia prunastri*** (L) Ach.: presenta un talo (sub)fruticuloso erecto (2-3 cm de alto) que también puede llegar a ser colgante (7-10 cm de longitud), y está ramificado con forma similar al asta de un ciervo. El color de la parte superior varía entre el verde-grisáceo y el verde oliva o verde-amarillento según si está seco o húmedo; sorolios laminares o marginales, soredios amarillentos; apotecios poco frecuentes, con un disco pardo rojizo y ascósporas simples, hialinas. Crece en bosques templados (sobre troncos y cortezas de robles, abetos y otras coníferas, etc.), en zonas de montañas del hemisferio norte, incluyendo Francia, Portugal, España, Norteamérica y la mayor parte de Europa Central (Nash y col., 2001). Sintetiza como metabolitos secundarios mayoritarios las depsidas ácido evérnico, atranorina y cloroatranorina; puede contener trazas de ácido fisódico y ácido úsnico (Kosanić y col., 2013).
- ***Parmotrema saccatilobum*** (Taylor) Hale: talo folioso coriáceo poco adherido al sustrato, de entre 8 y 15 cm de ancho, con lóbulos de entre 5-10 mm de ancho; color negro en la parte inferior con amplias zonas marrones en los márgenes, córtex superior de color gris a amarillo-verdoso y médula blanca; presenta isidios cilíndricos simples o ramificados de 0,1-0,3 mm, sin sorelios y sin cilios; raramente con apotecios, que son sésiles y de 5-8 mm de ancho. Crece principalmente en el este de Asia y puede aparecer también en ciertas zonas de Oceanía (Hale, 1974). Contiene atranorina, cloroatranorina y ácido protocetrárico (Joshi y col., 2009).
- ***Usnea ghattensis*** G.Awasthi: talo erecto fruticuloso de hasta 6 cm de altura y color marrón suave a oscuro; con ramificaciones principales rígidas (3 mm de diámetro), algunas partiendo de la base, y ramificaciones laterales muy densas, ennegrecidas en los ápices y superficie papilada. Pseudocilios, isidios y sorelios ausentes; córtex de una sola capa y axis central sólido incoloro; apotecios terminales de 8 mm de diámetro y márgenes ciliados, con 16-18 ascósporas. Crece sobre cortezas de árboles, y es endémico del noroeste de la India (Upreti y col., 2012). Como metabolito secundario mayoritario presenta el dibenzofurano ácido úsnico; también puede presentar ácido estíctico y constíctico (Behera y col., 2009).
- ***Vulpicida canadensis*** (Räsänen) J.-E. Mattson & M.J. Lai: talo folioso, que puede estar débilmente adherido al sustrato o (sub)erecto, formando rosetas orbiculares de 1,5-4,5 cm de ancho, a veces con algunos lóbulos largos y erectos (2-4 mm) que dan apariencia de talo fruticuloso corto; ramificaciones generalmente cortas y márgenes que parecen diseccionarse; no se observan proyecciones en el córtex superior, que tiene un color brillante amarillo intenso y mide 15-40  $\mu$ m de grosor; la médula también es de color amarillo; soredios e isidios ausentes; rizomas muy escasos o ausentes; apotecios comúnmente presentes de 1-4 mm de diámetro y que generan 8 ascósporas subesféricas.

Crece generalmente en las cortezas de coníferas en áreas soleadas y con alta humedad de Norte América (Montañas Rozosas, de British Columbia a Baja California) y Canadá (Nash y col., 2001). Presenta ácido úsnico en el córtex y los ácidos pinástrico y vulpínico en la médula; rara vez trazas de otras sustancias aromáticas (Nash y col., 2001).

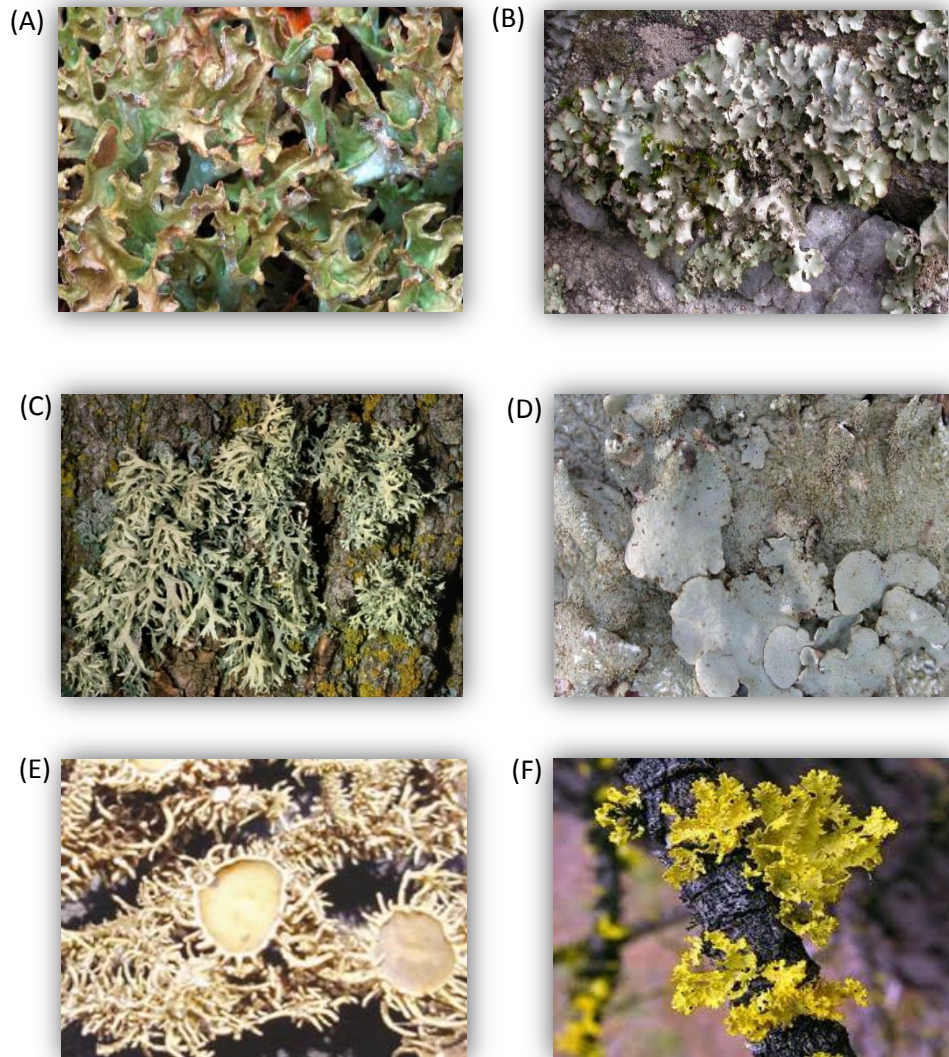


Figura 3. Especímenes representativos de las especies *Cetraria islandica* (A), *Cetreliella braunsiana* (B), *Evernia prunastri* (C), *Parmotrema saccatilobum* (D), *Usnea ghattensis* (E) y *Vulpicida canadensis* (F).



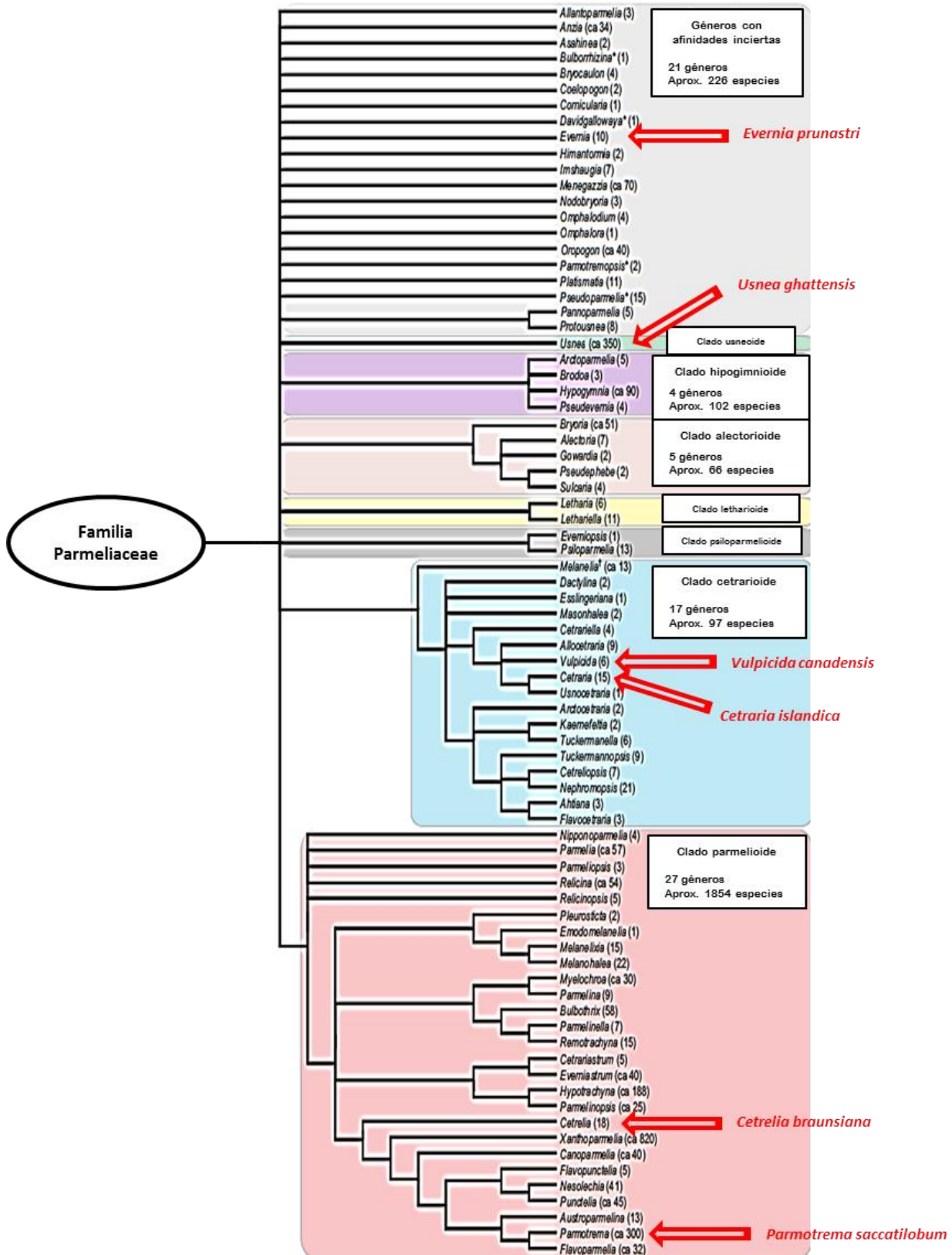


Figura 4. Clasificación filogenética de la familia *Parmeliaceae* y distribución de las especies objeto de estudio en los distintos clados (adaptado de Thell y col., 2012). Entre paréntesis el número de especies (aproximado) que se incluyen en cada género. El mayor o menor tamaño de los clados depende del número de géneros.



### 1.3. Fitoquímica y metabolismo secundario

#### 1.3.1. Composición química de los líquenes

Los líquenes presentan una química especial y relativamente compleja, ya que se trata de dos organismos diferentes (hongo y alga) que viven en asociación, y por tanto, producen cada uno sus propios metabolitos; sin embargo, en la literatura científica, se ha abordado el estudio de los constituyentes de los líquenes sin hacer distinción entre hongo y alga, sino como un único organismo.

Las primeras referencias a las diferencias químicas de los líquenes se remontan a la segunda mitad del siglo XIX (tal y como se recoge en Zopf, 1985). En el siglo XX, Asahina y Shibata (1954) impulsaron el estudio de la química de los líquenes y elucidaron las estructuras de numerosos compuestos presentes en líquenes. Pero fue en la segunda mitad del siglo cuando se estandarizó la cromatografía en capa fina (TLC) como procedimiento de rutina para la identificación de compuestos liquénicos, que serían utilizados como marcadores químicos (junto a los caracteres morfológicos) para la clasificación de los líquenes; a raíz de ello, se instauraría la llamada quimio-taxonomía (Huneck, 1999; Frisvad y col., 2008). El número de sustancias conocidas en los líquenes ha aumentado exponencialmente con la posterior introducción para su estudio de técnicas como HPLC (*high performance liquid chromatography*), RMN (resonancia magnética nuclear)  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , y espectroscopía de masas, que han permitido la elucidación estructural de numerosos compuestos (Elix, 1996; Elix y Wardlaw, 2000). Hasta la fecha, se han identificado más de 1050 compuestos procedentes de líquenes y a los que genéricamente se ha denominado “sustancias liquénicas” (Stocker-Wörgötter y col., 2013). De forma global, pueden clasificarse en (Honda y Vilegas, 1999; Le Pogam y col., 2014):

- **Compuestos primarios intracelulares:** se encuentran en el citoplasma y las paredes celulares y engloban a los compuestos procedentes del metabolismo primario, tales como proteínas, aminoácidos, polioles, carotenoides, polisacáridos y vitaminas. Estos compuestos son productos tanto del alga como del hongo y son imprescindibles para la supervivencia de las células y su desarrollo. Son compuestos no-específicos que aparecen también en otros hongos no liquenizados, algas y plantas superiores. La mayoría son solubles en agua y pueden extraerse en agua caliente. Algunos de ellos, como los polisacáridos de la pared celular liquenano e isoliquenano tienen significación taxonómica, y otros como los carotenoides se han usado para estudiar relaciones evolutivas.

- **Metabolitos secundarios extracelulares:** también se denominan “**ácidos liquénicos**”. Son mayoritariamente compuestos policíclicos que presentan grupos fenólicos en su estructura, entre los que destaca un gran grupo de compuestos que son específicos de líquenes: los poliquétidos (incluye a las depsidas, depsidonas y dibenzofuranos). Todos los metabolitos secundarios conocidos son sintetizados por el componente fúngico de la simbiosis o micobionte, y se depositan en la superficie de las hifas fúngicas. Sin embargo, los átomos de carbono necesarios para su síntesis son aportados por la actividad fotosintética del alga o fotobionte, que transfiere carbohidratos tipo glucosa o polioles (según el tipo de alga). Pueden presentarse en forma de acúmulos amorfos o formar cristales, y la mayoría sólo pueden extraerse con solventes orgánicos. No son indispensables para la supervivencia del organismo, pero han demostrado poseer una amplia variedad de actividades biológicas, y juegan un papel esencial en el establecimiento de la simbiosis, como mecanismos de defensa y en la interacción de los simbiontes con el ambiente (Armaleo, 1995; Huneck, 2001; Zambare y Christopher, 2012). Así, más del 50% de los metabolitos secundarios son sintetizados para sustentar y proteger el talo liquénico de diversos factores bióticos y abióticos (Dayan y Romagni, 2002), entre los que se incluyen los derivados de orcinol y  $\beta$ -orcinol (depsidas, depsidonas y dibenzofuranos). En este grupo se encuadran también los compuestos que presentan mayor interés desde el punto de vista farmacológico.

### **1.3.2. Metabolitos secundarios**

Los metabolitos secundarios de los líquenes, como se ha comentado anteriormente, son en su mayoría compuestos orgánicos de naturaleza policíclica. Pueden acumularse tanto en el córtex (p. ej., atranorina, parietina, ácido úsnico, etc.) como en la médula (p. ej., ácido fisódico y ácido protocetrárico) del talo liquénico, y suponen entre el 0,1 y el 10% del peso seco de éste (5-10 % es lo más común), llegando en ciertas ocasiones hasta el 30 % (Solhaug y col., 2009). Aunque son sintetizados por el micobionte, hay ciertas evidencias que demuestran que el fotobionte tiene una gran influencia en el metabolismo secundario del micobionte. De hecho, cuando el micobionte se cultiva aislado (en ausencia de fotobionte), puede sintetizar en algunos casos sustancias totalmente diferentes a los metabolitos que se encuentran en la simbiosis en la naturaleza (Yoshimura y col., 1994; Brunauer y col., 2007). Recientemente, también se ha identificado la presencia de hongos endófitos y bacterias en algunas simbiosis liquénicas, sin que hasta el momento haya podido aclararse el efecto que ejercen en la química (y en la ecología) del talo liquénico.

La especificidad de los metabolitos secundarios ha sido utilizada para la delimitación de especies, en ocasiones de manera muy acertada (Schmitt y Lumbsch, 2004; Xu y col., 2016). Muchos metabolitos, concretamente depsidas, depsidonas, dibenzoquinonas y dibenzofuranos, se consideran exclusivos de líquenes, aunque actualmente se ha demostrado la presencia de algunos de estos compuestos en hongos no liquenizados e incluso en angiospermas bajo ciertas condiciones. No obstante, son escasos los ejemplos de metabolitos secundarios liquénicos fuera de estos organismos (Abdou y col., 2010; Hutner y col., 2010).

La clasificación tradicional divide a los metabolitos liquénicos en tres grandes grupos: sustancias alifáticas, sustancias liquénicas aromáticas y carbohidratos o polisacáridos (Dayan y Romagni, 2001). Pero se han propuesto, posteriormente, otras clasificaciones más detalladas en función de las estructuras químicas de las sustancias liquénicas. Según éstas, los principales metabolitos secundarios pueden clasificarse en los siguientes grupos (Müller, 2001; Stocker-Wörgötter, 2008) (Figura 5):

- **Compuestos fenólicos monocíclicos:** incluyen a los derivados del orcinol/ácido orselínico (como el metil-orselinato) y  $\beta$ -orcinol, que son generalmente intermediarios de la síntesis de depsidas. Rara vez se identifican en los talos, ya que los metabolitos que se suelen extraer son los compuestos finales de una ruta biosintética (p. ej., depsidas).
- **Depsidas:** constituyen uno de los grupos más abundantes de sustancias liquénicas (p. ej., atranorina, ácido barbático, etc.). Se trata de compuestos naturales aromáticos, estructuralmente constituidos por dos unidades (orcinol y/o  $\beta$ -orcinol), unidas por un enlace éster, éter o carbono-carbono, con diversos sustituyentes en los anillos aromáticos, entre los que se incluyen hidroxilos fenólicos.
- **Depsidonas:** se ha descrito que proceden del acoplamiento fenólico oxidativo intramolecular de *para*-depsidas. Presentan un enlace éter adicional al enlace éster de las depsidas, y forman un sistema policíclico muy estable (p. ej., ácido protocetrárico, ácido salazínico, etc.).
- **Dibenzofuranos:** son derivados de fluoro-acetofenona, relativamente abundantes en la mayoría de especies liquénicas. Los más comunes son los dos isómeros del ácido úsnico, que aparecen en el córtex de muchas especies de líquenes (p. ej., *Usnea* sp.), depositándose como cristales sobre las hifas fúngicas.
- **Quinonas:** compuestos aromáticos que incluyen cromonas, xantonas y antraquinonas (p. ej., parietina, liquexantona, etc.), y que se generan por ciclación interna de la cadena de poliquétidos; en ocasiones, algunos de estos compuestos liquénicos son análogos a otros

productos encontrados en hongos libres o en plantas superiores. Diversas naftoquinonas son pigmentos comunes de los líquenes.

- **Derivados del ácido pulvínico:** son sintetizados por una ruta biosintética diferente a la mayoría de metabolitos secundarios (la del ácido shikímico) y requieren como intermediarios para su síntesis diversos aminoácidos como fenilalanina, tirosina y triptófano. Este grupo abarca pigmentos amarillos y naranjas presentes en muchos líquenes, entre los cuales se incluye el metabolito ácido vulpínico.

- **Ácidos alifáticos o lactonas:** los poliquétidos alifáticos están generalmente formados por una unidad de acetil-CoA y 8 unidades de malonil-CoA. Su síntesis es relativamente compleja, involucrando distintas etapas (Stocker-Wörgötter, 2008). Uno de los más característicos de líquenes es el ácido protoliquesterínico.

Además de los compuestos anteriormente mencionados (representados en la Figura 5), comunes en la mayoría de grupos de líquenes, se han identificado otros compuestos que pueden ser considerados inusuales; por ejemplo, los compuestos derivados de aminoácidos llamados ésteres de escabrosina, cuya presencia se describe en *Xanthoparmelia scabrosa* (Ernst-Russell y col., 1999) o las xantona-glucósidos de *Umbilicaria proboscidea* (Rezanka y col., 2003). También se ha descrito la presencia de compuestos como carotenoides y terpenoides, compartidos con plantas superiores y otros hongos, pero que también pueden ser responsables de importantes actividades biológicas.

Numerosos estudios han demostrado que los metabolitos secundarios presentan una gran variedad de actividades biológicas, jugando un papel muy importante en la supervivencia del liquen (actividades abióticas, anti-herbívoros o protectoras frente a la radiación UV, entre otras) y por las que presentan interés farmacológico (p. ej., propiedades antibióticas, anti-inflamatorias y citotóxicas, entre otras).

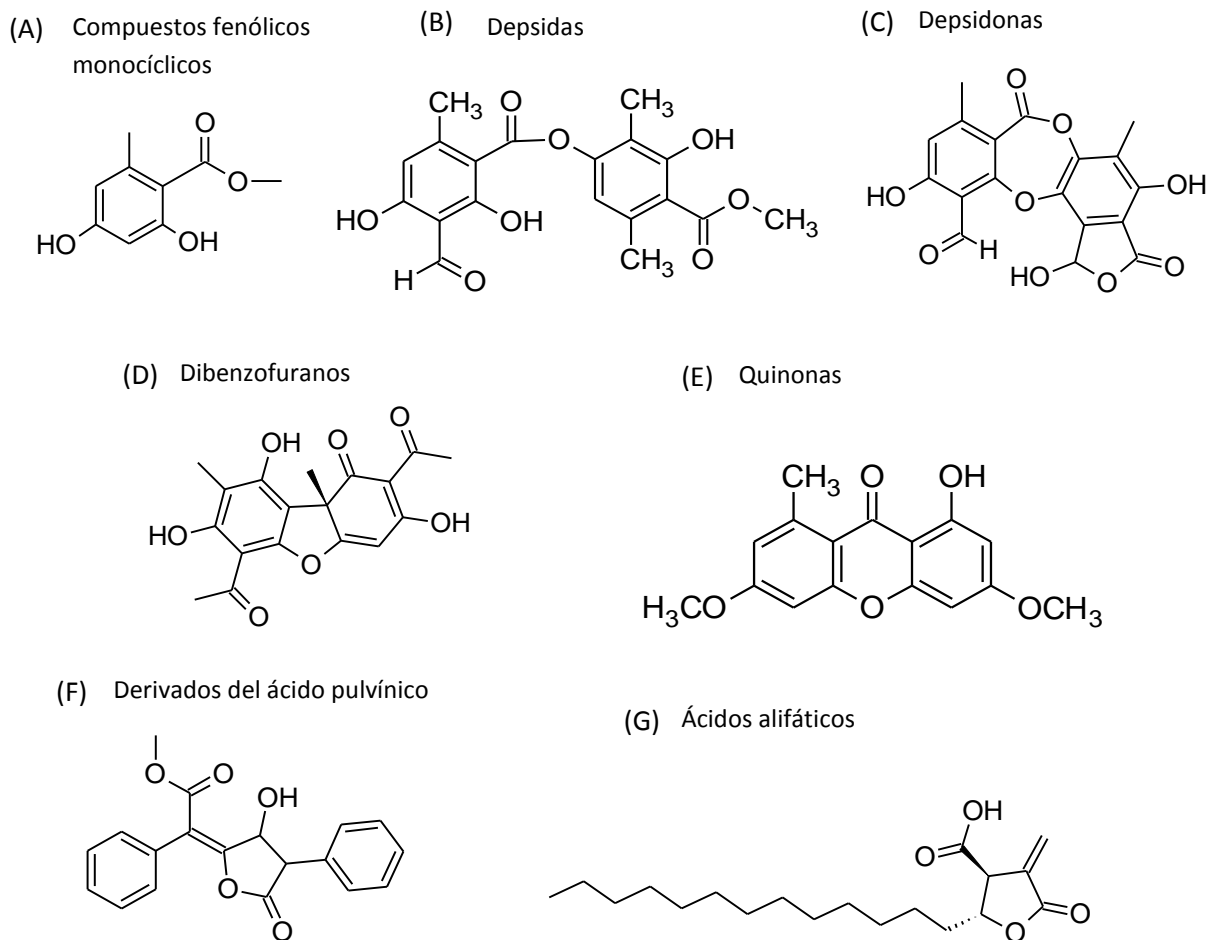


Figura 5. Estructuras químicas de ejemplos de metabolitos secundarios de líquenes según grupos de estructuras: (A) metil-orselinato, (B) atranorina, (C) ácido salazínico, (D) (+)-ácido úsnico, (E) liquexantona, (F) ácido vulpínico y (G) ácido proto-liquesterínico.

### 1.3.3. Rutas biosintéticas

La variedad de estructuras de metabolitos secundarios mencionadas anteriormente, casi todos ellos compuestos fenólicos, se origina por distintas rutas metabólicas. Existen 4 principales vías biosintéticas en líquenes, que se resumen en la Figura 6 y se recogen a continuación (Huneck, 1999):

- **Ruta del acetato-polimalonato:** por esta vía se sintetizan los metabolitos secundarios más característicos y específicos de los líquenes, como las depsidas, depsidonas y dibenzofuranos, que también son los de mayor interés farmacológico. Esta ruta biosintética tiene lugar en las células del hongo cuando está en asociación con el alga. Los compuestos resultantes de esta vía se denominan de forma general poliquétidos o acetogeninas, y juegan un papel importante en la simbiosis; por ejemplo, se ha propuesto que las depsidas y depsidonas son esenciales en

la propiedad de la poiquilohidria de los líquenes (Armaleo y col., 2008). Las principales enzimas implicadas en esta ruta biosintética de líquenes son las poliquétido sintasas tipo I (no reductoras), que generan el núcleo cíclico de los poliquétidos; pero en la formación de la estructura final de estos compuestos también intervienen enzimas adaptadoras como oxido-reductasas e hidrolasas, entre otras.

- **Ruta del ácido shikímico:** por esta ruta se sintetizan principalmente los derivados del ácido pulvínico y algunos derivados de quinonas (p. ej., terpenilquinonas), que resultan de la fusión de dos unidades de fenilpiruvato. Estos compuestos están principalmente presentes en la familia de líquenes *Stictaceae*.

- **Ruta del ácido mevalónico:** es la responsable de la síntesis de compuestos terpénicos, de los cuales los triterpenos son los más abundantes en líquenes (no se ha descrito la presencia de sesquiterpenos, y los diterpenos son muy escasos). Se han identificado al menos 20 triterpenos diferentes procedentes de líquenes, de los cuales la zeorina es el más común, estando presente en diversas especies líquénicas (Boustie y Grube, 2005).

- **Rutas fotosintéticas en las células del fotobionte:** a través de ella se sintetizan diversos mono y polisacáridos, algunos de los cuales son utilizados como fuente de átomos de carbono en las otras rutas, en especial en la síntesis de poliquétidos.

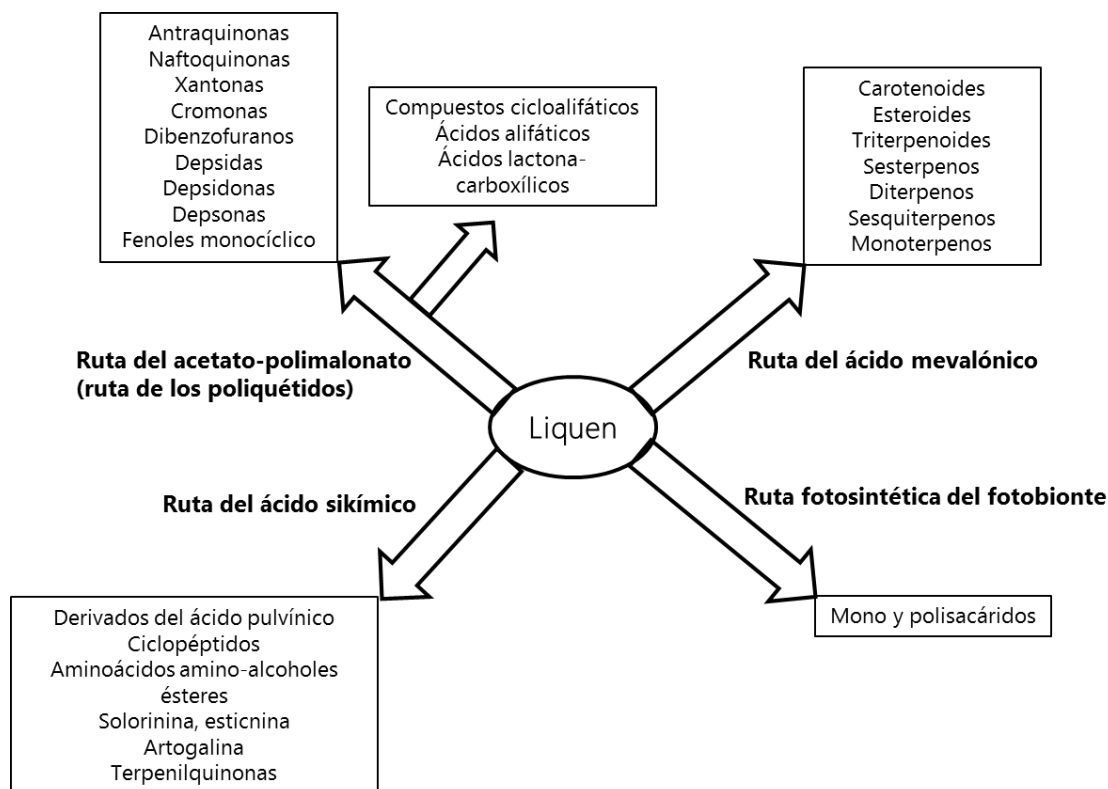


Figura 6. Clasificación de los metabolitos líquénicos según rutas biosintéticas (adaptada de Huneck, 1999).

### 1.3.4. Enzimas poliquétido sintasas (PKS)

Los poliquétidos se sintetizan por la vía del acetato-polimalonato en reacciones secuenciales catalizadas por enzimas poliquétido sintasas. Las PKS son grandes complejos multienzimáticos que contienen un núcleo donde se coordinan los sitios activos. La biosíntesis de los poliquétidos tiene cierta similitud con la elongación de la cadena de ácidos grasos, pues ocurre paso a paso desde sintones de 2, 3 y 4 carbonos como acetil-CoA, propionil-CoA, butiril-CoA y sus derivados activados malonil, metilmalonil y etilmalonil-CoA.

Las PKS presentan distintos tipos de dominios: un dominio principal quetoacil-sintasa muy conservado (KS), acil-transferasa (AT), queto-reductasa (KR), deshidratasa (DH), enoil-reductasa (EnR) y una proteína transportadora acil-carrier (ACP). El principal paso en la construcción de la cadena de los poliquétidos es una condensación descarboxilativa, que se lleva a cabo por el dominio quetoacil-sintasa (KS) de la enzima (Simpson, 2014). Los dominios KS, AT y ACP son esenciales y se consideran como los requisitos funcionales mínimos de estas enzimas, mientras que KR, DH y EnR catalizan reacciones de reducción y no siempre están presentes en las PKS de hongos. Según los dominios funcionales de las PKS, la síntesis de los poliquétidos puede suceder con modificación de todos, alguno o ninguno de los grupos funcionales, existiendo una gran variedad de compuestos con distintos niveles de complejidad, desde poliquétidos reducidos a parcialmente reducidos o completamente oxidados. Además, la estructura final de los poliquétidos puede modificarse por enzimas adaptadoras (*"tailoring enzymes"*) tipo monooxigenasas, hidrolasas, etc. (Armaleo y col., 2011; Abdel-Hameed y col., 2016).

La mayoría de los poliquétidos específicos de líquenes son poliquétidos oxidados (p. ej., depsidas, depsidonas, dibenzofuranos...) y, por tanto, su síntesis será controlada por genes de **PKS no reductoras** (Schmitt y col., 2005). De entre la diversidad de PKS existentes, se ha descrito que son las **PKS tipo I iterativas** las responsables de la síntesis de los poliquétidos líquénicos. Éstas son complejos proteicos que usan los sitios activos de sus dominios repetidamente, añadiendo unidades de dos o más carbonos (ésteres de CoA) al poliquétido en formación en cada ciclo de condensación (Stocker-Wörgötter, 2008). Hasta ahora, los genes de PKS identificados en hongos se han encontrado en *clusters* (agrupaciones secuenciales de genes en un tramo del genoma). En ellos, los fragmentos génicos que codifican para el dominio KS son altamente conservados y se pueden utilizar (mediante PCR con el uso de *primers* adecuados) para estudios filogenéticos y la elucidación de relaciones evolutivas (respecto a la diversidad metabólica) de familias de líquenes (Grube y Blaha, 2003; Schmitt y col., 2005).

### 1.3.5. Bioactividad de los metabolitos secundarios

Existen diversos estudios y teorías sobre la función de los metabolitos secundarios en los líquenes, que ha tratado de justificarse de diversas maneras, aunque no han sido tan profundamente estudiados como otros grupos de productos naturales. Desde que se inició su estudio, se han propuesto diversas funciones (como se recoge en la revisión de Huneck, 1999): (a) los líquenes son organismos de crecimiento muy lento y requieren estos metabolitos como “antibióticos” para su desarrollo; (b) los metabolitos secundarios aromáticos absorben radiación UV y protegen a los ficobiontes de radiaciones perjudiciales; (c) las sustancias líquénicas aumentan la permeabilidad de las paredes celulares del fotobionte; (d) algunas sustancias líquénicas forman complejos con iones metálicos y proporcionan al liquen minerales procedentes del sustrato; (e) son compuestos “de estrés” producidos por las plantas bajo condiciones extremas; (f) muchos compuestos líquénicos se segregan a la médula y tienen propiedades hidrofóbicas, protegiendo frente a la desecación del tejido y permitiendo intercambio gaseoso con la atmósfera, etc.

Las actividades biológicas demostradas hasta la fecha para los metabolitos secundarios, junto a algunos ejemplos, se resumen a continuación (Molnar y Farkas, 2010; Shukla y col., 2010; Zambare y col., 2012; Xu y col., 2016):

- **Efectos en la homeostasis de metales y en la resistencia a la contaminación ambiental:** la sensibilidad de los líquenes a los metales pesados es especie-específica y depende del tipo y niveles de metabolitos secundarios sintetizados. Por ejemplo, cuando el talo de *Hypogymnia physodes* se transplanta a áreas contaminadas con metales pesados y compuestos sulfurados, se observa que varía el patrón de producción de metabolitos secundarios, reduciendo los niveles de atranorina, ácido fisódico y ácido hidroxifisódico, y aumentando la producción de ácido fisodálico; estos resultados sugieren que el ácido fisodálico juega un papel importante en la protección frente a la polución por metales pesados (Białonska y Dayan, 2005). El ácido fumarprotocetrárico ha demostrado capacidad de reducir la absorción de  $Mn^{2+}$  por parte del talo líquénico de *Lecanora conizaeoides*, favoreciendo la tolerancia a la contaminación por altos niveles de ese metal (Hauck y Huneck, 2007).
- **Fotoprotección:** los líquenes usan la síntesis de metabolitos secundarios como una estrategia para proteger a los fotosimbiontes que son sensibles a elevados niveles de luz y a los efectos perjudiciales de la radiación ultravioleta (que inhibe la fotosíntesis y daña el ADN). Desde que Ertl (1951) formuló la teoría de la fotoprotección, diversos metabolitos secundarios



de líquenes han demostrado ejercer esta acción, entre ellos la atranorina, calicina, ácido pinástrico, ácido úsnico, ácido vulpínico, etc. Además, las radiaciones UV-A y UV-B inducen la producción de ciertos compuestos fenólicos, lo que sugiere su papel fotoprotector.

- **Alelopatía:** los metabolitos secundarios de líquenes actúan como agentes “aleloquímicos” afectando el desarrollo de líquenes vecinos (en la competencia por ocupar ciertos espacios) y otras plantas vasculares, así como de microorganismos. Liberados al exterior celular, pueden afectar a la fotosíntesis de otros organismos, la transpiración, la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, entre otros. Por ejemplo, Marante y col. (2003) demostraron actividad alelopática para varios compuestos fenólicos presentes en *Lethariella canariensis* frente a la germinación de semillas de plantas comunes de jardín. Anterior es el conocimiento de la actividad antimicrobiana de las sustancias liquénicas (Lawrey, 1989), propiedad muy relevante en su interés farmacológico (se detalla más adelante).

- **Actividad insecticida y protección frente al ataque de herbívoros.** Por ejemplo, el ácido caperático (presente en los extractos de *Flavoparmelia baltimorensis* y *Xanthoparmelia cumberlandia*) presentó toxicidad frente a la serpiente herbívora *Pallifera varia* (Lawrey, 1989). También, cabe destacar que muchos casos de intoxicación de alces se han atribuido a la ingestión del liquen *Xanthoparmelia chlorochroa* y, en concreto, a su elevado contenido en ácido úsnico y otros metabolitos secundarios (Cook y col., 2007).

Existen casos de metabolitos secundarios muy similares estructuralmente que a menudo desarrollan actividades biológicas muy diferentes. Es el caso de los ácido barbático y difractaico, que difieren tan sólo en una unidad funcional pero presentan efectos divergentes: el ácido barbático inhibe marcadamente el crecimiento del alga *Trebouxia jamesii* y reduce su tasa de mitosis, mientras que el ácido difractaico no ejerce ningún efecto regulatorio sobre el alga (Hager y col., 2008).

Cabe destacar aquí la posible toxicidad demostrada por algunos líquenes y sus metabolitos en ciertas condiciones, y que debe tenerse muy en cuenta en sus potenciales aplicaciones farmacológicas. Por ejemplo, existen evidencias sobre la capacidad de ciertas sustancias aromáticas liquénicas para generar alergias (dermatitis) de contacto debido a sus efectos fotosensibilizantes; ya en 1965 se describió este problema para el ácido úsnico (Mitchell, 1965), y posteriormente también se ha demostrado para diversos compuestos (p. ej., atranorina, ácido fisódico, ácido estíctico, etc.) (Molnar y Farkas, 2010; Xu y col., 2016). Además, recientemente, se ha descubierto la presencia de micotoxinas en ciertos extractos liquénicos (Burkin y Kononenko, 2014).

Por último, resulta interesante resaltar el efecto de “bio-deterioro” que ejercen algunos líquenes sobre ciertos edificios de interés histórico, frescos o incluso ventanas de catedrales. Este efecto se debe principalmente a la reacción del ácido oxálico secretado por los líquenes con el carbonato cálcico del sustrato, que altera la superficie de éste (Adamo y Violante, 2000).

## 1.4. Propiedades farmacológicas

### 1.4.1. Uso etnomedicinal

A lo largo de los siglos, diversos líquenes han sido utilizados por los seres humanos como alimento, para fabricar colorantes o tintes para tejidos y perfumes, en la elaboración de bebidas, en decoración o como remedios en la medicina tradicional (Llano, 1948).

En el “Tratado de Plantas Medicinales”, Dioscórides (s. I d.C.) ya escribe sobre las propiedades medicinales del llamado “liquen arbóreo”: *“aplicado como emplasto, restaña la hemorragia, alivia las inflamaciones y cura las cura las excrecencias cutáneas. Es útil para los que padecen de ictericia y, untada la boca y la lengua con él, mezclado con miel, alivia las fluxiones”*; también destaca sus propiedades astringentes y frente al cansancio (López y col., 2006). Anteriormente, Hipócrates (siglo V a.C.) recomendaba para trastornos uterinos el empleo de un preparado que podría corresponder a *Usnea barbata* o especies afines. Existen referencias de que *Usnea longissima* fue empleada en la antigua China como expectorante y para el tratamiento de úlceras (Vartia, 1973). Pero la que es posiblemente la primera referencia al uso de líquenes como remedios medicinales data del siglo XVII-XVIII a.C. y se atribuye a la especie *Evernia furfuracea* (Launert, 1981). En épocas posteriores, se han mantenido como remedios frecuentes en las medicinas tradicionales de distintas partes del mundo, ya que se les atribuían propiedades beneficiosas en el tratamiento frente a la tos, la ictericia, la rabia o para restaurar la pérdida de cabello. Durante la Edad Media, los líquenes ocupaban un lugar importante entre las hierbas utilizadas por los médicos de la época (Pereira, 1853).

La mayoría de usos etnomedicinales de las especies liquénicas, sobre todo en Europa, están basados en la llamada “teoría de las signatures” del siglo XV, que venía a decir que una planta podría tratar las enfermedades que se parecieran a ella (Rizzini, 1952). Entre los más conocidos, cabe destacar los siguientes:

- *Lobaria pulmonaria* para el tratamiento de enfermedades respiratorias, y también como cicatrizante y antiséptico.
- *Xanthoria parietina* para tratar la ictericia.
- *Parmelia sulcata* en afecciones craneales, como la parálisis de músculos faciales o el dolor de cabeza.
- Especies de *Usnea* con el fin de fortalecer el cabello y evitar su caída.
- *Peltigera aphthosa* como vermífugo y para tratar úlceras (en especial, llagas en la mucosa bucal en los niños).
- Ciertas preparaciones de *Peltigera canina* se han utilizado para tratar la rabia.
- *Cetraria islandica* (liquen islándico) ha sido uno de los más utilizados en medicina tradicional y se le atribuían propiedades beneficiosas en enfermedades pulmonares, de riñón y vejiga, en inflamación de mucosas o incluso para el tratamiento del cáncer (Malhotra y col., 2007; Illana-Esteban, 2012). En los últimos años, se incluyó en la Farmacopea Europea (European Pharmacopeia, 2005).

En Europa, particularmente, destaca el uso tradicional de los líquenes en la preparación de infusiones o decocciones que debían ser bebidas para el tratamiento de afecciones del tracto respiratorio o del sistema digestivo. Otros usos comunes de los líquenes se han relacionado con el tratamiento de infecciones de transmisión sexual y afecciones del tracto urinario. Incluso se ha llegado a documentar el uso de líquenes en mezclas de plantas que se fumaban (Illana-Esteban, 2012; Crawford, 2015). En cuanto a la medicina tradicional de España, se ha registrado, por ejemplo, el uso de decocciones de *Pseudevernia furfuracea* para el tratamiento de enfermedades respiratorias en los pueblos de Alcafar y Viznar (Andalucía), y *Ramalina bourgeana* se ha consumido con fines diuréticos y para disolver piedras de vejiga urinaria y riñón (González-tejero y col., 1995).

Por otro lado, muchos líquenes se han utilizado externamente (p. ej., como emplastos o linimentos) para cubrir heridas, tanto para detener el sangrado como a modo de desinfectantes. También se ha registrado su aplicación tópica para infecciones y úlceras, incluyendo las yagas de la boca; se cree que de este uso puede derivar el nombre de liquen, que procede del griego antiguo *leikhēn* (puede traducirse como “que come lo que está a su alrededor”) (Crawford, 2015).

En general, se han documentado un total de 52 géneros de líquenes utilizados en medicina tradicional en las distintas culturas del mundo. En la Tabla 2, se recogen los más comunes. Es posible que el género más usado en todo el mundo sea *Usnea*, aunque a menudo

se ha utilizado como sinónimo de otros líquenes arbóreos fruticulosos. Aún hoy existen preparados fitoterapéuticos que contienen líquenes del género *Usnea* en su composición; por ejemplo, Granobil® presenta en su composición extracto de *Usnea barbata* y se indica como tónico-estimulante. Además de *Usnea*, los géneros *Cladonia*, *Lobaria*, *Peltigera* y *Ramalina* también destacan por su empleo ubicuo en remedios medicinales, mayoritariamente en zonas de Norte América, Europa y Asia. El uso de líquenes del género *Cetraria* en medicina tradicional se restringe al continente europeo, y diversas especies de *Thamnolia* al continente asiático. El género *Lethariella* se ha empleado ampliamente en la Medicina Tradicional China, mientras que *Parmotrema* y *Everniastrum* se han utilizado en la medicina tradicional de India, por ser las zonas geográficas donde crecen de forma endémica.

Género	Área de uso
<i>Usnea</i>	Todo el mundo (excepto Australia)
<i>Evernia</i> y <i>Pseudevernia</i>	Europa y Norte de África
<i>Letharia</i>	Norte América
<i>Lethariella</i>	China
<i>Cetraria</i>	Europa
<i>Parmotrema</i> y <i>Everniastrum</i>	India
<i>Xanthoparmelia</i>	Norte América y África
<i>Cladonia</i> y <i>Cladina</i>	Norte América, Europa y Asia
<i>Thamnolia</i>	Asia
<i>Ramalina</i>	Norte América, Europa y Asia
<i>Lobaria</i> y <i>Peltigera</i>	Norte América, Europa y Asia
<i>Umbilicaria</i>	Norte América y Asia

Tabla 2. Géneros de líquenes más utilizados en medicina tradicional y su correspondiente área geográfica principal de uso (Crawford, 2015).

La mayoría de los usos en medicina tradicional de los líquenes son probablemente debidos a la presencia de metabolitos secundarios, algunos de los cuales han demostrado ser farmacológicamente activos; así, hace tiempo se describió su capacidad de actuar como antibióticos (Burkholder y col., 1944). Sin embargo, algunos de sus usos tradicionales también se justifican por la presencia de carbohidratos (p. ej., liqueninas, isoliqueninas y galactomananos) e implican la cocción de los líquenes con el fin de crear un mucílago (dichas moléculas absorben agua con facilidad y forman geles) que es bebido o aplicado tópicamente según el tipo de dolencia (Crawford, 2007).

En las últimas dos/tres décadas ha existido un renovado interés por las aplicaciones farmacológicas de los líquenes y numerosos estudios han permitido validar, en cierto modo, su uso tradicional. Además, otros estudios sobre ciertas especies de líquenes y metabolitos aislados han demostrado actividades farmacológicas diferentes a las de su empleo tradicional, obteniéndose resultados interesantes que se detallarán a continuación.

#### **1.4.2. Actividades farmacológicas de los líquenes parmeliáceos**

Las compuestos liquénicos, y los extractos que los contienen, han demostrado un amplio rango de actividades biológicas con interés farmacológico. Las propiedades mejor estudiadas incluyen: antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatoria, analgésica/antipirética, actividad inhibitoria de enzimas y efectos antiproliferativos y citotóxicos (Zambare y Christopher, 2012; Gómez-Serranillos y col., 2014).

Los metabolitos secundarios de líquenes constituyen un campo de la investigación farmacológica de productos naturales cuyo estudio no está tan desarrollado como el de hongos de vida libre o plantas superiores. Ha sido en las últimas dos/tres décadas cuando ha empezado un estudio más exhaustivo del potencial farmacológico de los líquenes que ha revelado resultados prometedores (Shukla y col., 2010). En la bibliografía científica existen diversos trabajos sobre las propiedades farmacológicas de los líquenes de la familia *Parmeliaceae*, que han sido compilados en la revisión recientemente publicada por nuestro grupo (Gómez-Serranillos y col., 2014). En este trabajo se recoge toda la información disponible hasta el momento respecto al potencial farmacológico de extractos y compuestos aislados de líquenes parmeliáceos, incluyendo referencias a más de 65 especies (de 21 géneros distintos) y a más de 75 metabolitos secundarios identificados en especies de la familia (resumen en Tablas 3 y 4).

Los géneros mejor estudiados desde el punto de vista farmacológico son *Parmelia* y *Usnea*. A nivel de especie, cabe destacar *Cetraria islandica*, *Hypogymnia physodes*, *Evernia prunastri* y *Pseudevernia furfuracea* como aquellas que han atraído un mayor número de estudios. Las propiedades más estudiadas han sido las antimicrobianas (antibacteriana y antiviral) y el potencial anticancerígeno (efectos antiproliferativos, actividades citotóxicas y efectos anti-genotóxicos). En cuanto a los compuestos puros, el mayor número de estudios recaen sobre la atranorina y el ácido úsnico.

Género	Nº de especies estudiadas	Especie con más estudios	Actividades farmacológicas estudiadas en el género	Nº de artículos revisados
<i>Bryoria</i>	2	<i>B. fusfencens</i> , <i>B. capillaris</i>	Actividad antioxidante y anti-genotóxica	2
<i>Cetraria</i>	5	<i>Cetraria islandica</i>	Actividad antioxidante, antimicrobiana, anti-genotóxica, antiinflamatoria, inmunomoduladora, anti-ulcerogénica y anti-tumorigénica	18
<i>Evernia</i>	1	<i>Evernia prunastri</i>	Actividad antioxidante, antimicrobiana, anti-genotóxica y citotóxica	6
<i>Flavoparmelia</i>	1	<i>Flavoparmelia caperata</i>	Actividad antioxidante, antimicrobiana y citotóxica	2
<i>Hypogymnia</i>	3	<i>Hypogymnia physodes</i>	Actividad antioxidante, antimicrobiana, anti-genotóxica, citotóxica y anti-mutagénica	10
<i>Lethariella</i>	5	<i>L. cahmeriana</i> , <i>L. cladonioides</i> , <i>L. sermaderi</i> , <i>L. sinensis</i> , <i>L. zahlbruckneri</i>	Actividad antioxidante, efectos quimiopreventivos, anti-obesidad, hipolipemiente y citotóxica	5
<i>Nephromopsis</i>	3	<i>N. asahinae</i> , <i>N. ornata</i> , <i>N. pallescens</i>	Actividad antioxidante y antimicrobiana	3
<i>Parmelia</i>	13	<i>Parmelia caperata</i> , <i>Parmelia sulcata</i>	Actividad antioxidante, antimicrobiana, citotóxica, anti-genotóxica, hipoglicémica e inhibitoria de enzimas	25
<i>Parmotrema</i>	5	<i>Parmotrema pseudotinctorum</i>	Actividad antioxidante, antimicrobiana, citotóxica, anti-diabética e inhibitoria de enzimas	9
<i>Platismatia</i>	1	<i>Platismatia glauca</i>	Actividad antimicrobiana y citotóxica	2
<i>Pseudephebe</i>	1	<i>Pseudephebe pubescens</i>	Actividad antioxidante	2
<i>Pseudevernia</i>	1	<i>Pseudevernia furfuracea</i>	Actividad antioxidante, antimicrobiana, anti-genotóxica, antiinflamatoria y anti-nociceptiva	10
<i>Usnea</i>	13	<i>Usnea longissima</i>	Actividad antioxidante, antimicrobiana, citotóxica, antiinflamatoria, anti-genotóxica, anti-ulcerogénica, antitrombótica, anti-plaquetaria e inhibitoria de enzimas	27
<i>Xanthoparmelia</i>	3	<i>X. conspersa</i> , <i>X. camtschadalis</i> , <i>X. pokorny</i>	Actividad antioxidante y antimicrobiana	2

Otros géneros con un sólo estudio revisado: *Alectoria* (*A. nigricans*), *Canoparmelia*, *Cetrariella* (*C. delisei*), *Flavocetraria* (*F. nivalis*), *Melanella* (*M. hepaticum*), *Parmelinella* (*P. simplicior*) y *Protosnea* (*P. poeppigii*).

Tabla 3. Resumen de los principales géneros de *Parmeliaceae* de los que se ha estudiado alguna propiedad farmacológica.

Metabolito	Tipo de estructura	Nº de especies en que se ha identificado	Actividades farmacológicas estudiadas	Nº de artículos revisados
Etil-hematomato	Compuesto fenólico monocíclico	2	Actividad antiinflamatoria, antioxidante y citotóxica	2
Ácido evérnico	Depsida	3	Actividad antioxidante, antimicrobiana y antitumoral/citotóxica	3
Ácido girofórico	Depsida	2	Actividad antimicrobiana y citotóxica	2
Ácido 3-hidroxi-fisódico	Depsidona	2	Actividad antimicrobiana, citotóxica y protectora frente a daño citogenético	3
Isoliquenano y liquenano	Polisacáridos	2	Actividad anti-tumoral	2
Ácido lecanórico	Depsida	3	Actividad antioxidante, antimicrobiana y citotóxica	4
Metil-hematomato	Compuesto fenólico monocíclico	2	Actividad antioxidante y antimicrobiana	2
Ácido olivetórico	Depsida	2	Actividad anti-angiogénica y antimicrobiana	2
Ácido fisodálico	Depsidona	1	Actividad citotóxica y protectora frente a daño citogenético	2
Ácido fisódico	Depsidona	5	Actividad antioxidante, antimicrobiana, citotóxica y protectora frente a daño citogenético	7
Ácido protocetrárico	Depsidona	2	Actividad antioxidante, antimicrobiana y citotóxica	3
Ácido protoliquesterínico	Ácido alifático	5	Actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, citotóxica, anti-VIH e inhibitoria de enzimas	9
Ácido psorómico	Depsidona	2	Actividad antioxidante, citotóxica y cardioprotectora	2
Ácido salazínico	Depsidona	6	Actividad antioxidante, antimicrobiana, citotóxica y cicatrizante	7
Ácido úsnico	Dibenzofurano	23	Actividad antiinflamatoria, antioxidante, antimicrobiana, anti-leishmania, citotóxica, cardioprotectora, hepatoprotectora y cicatrizante	24

Tabla 4. Principales metabolitos identificados en líquenes parmeliáceos de los que se ha estudiado alguna actividad farmacológica. Del total de 75 compuestos recogidos en Gómez-Serranillos y col. (2014), se presentan en esta tabla los más relevantes desde el punto de vista farmacológico (sobre los que hay referencias en más de un artículo).

**Actividad antimicrobiana.** Tanto los extractos como los metabolitos aislados de líquenes de *Parmeliaceae* han demostrado actividades antibacterianas, antifúngicas, antivirales y anti-protozoarias frente a diversos organismos patógenos humanos (Zambare y Christopher, 2012). De la revisión bibliográfica, se desprende que los líquenes parmeliáceos presentan una actividad antimicrobiana mayor que las especies de otras familias. En general, los extractos con disolventes orgánicos resultaron ser más activos que los acuosos, lo cual se debe a la

escasa solubilidad en agua de los metabolitos secundarios. El efecto antimicrobiano de estos agentes es mayor frente a bacterias gram positivas que frente a otros microorganismos, y la potencia de los metabolitos aislados es mayor en comparación a los extractos (Gómez-Serranillos y col., 2014). Las especies con mayor potencial antimicrobiano pertenecen a los géneros *Cetraria*, *Hypogymnia*, *Parmelia*, *Parmotrema*, *Pseudevernia* y *Usnea*. Una de las sustancias líquénicas más activas como agente antimicrobiano es el ácido úsnico (dibenzofurano) (Cochietto y col., 2002), pero también han demostrado actividades interesantes compuestos con estructuras diferentes, tales como atranorina, ácido lecanórico, ácido estictico, etc. (Rankovic y col., 2008; Rankovic y Mišić, 2008). Como ejemplo de actividad antiviral frente a virus humanos podemos señalar el efecto inhibitorio de la retrotranscriptasa del virus VIH de la butirolactona ácido protoliqueterínico (aislado de *Cetraria islandica*) o la capacidad del ácido úsnico de inhibir la activación del virus de Epstein-Barr (Pengsuparp y col., 1995; Yamamoto y col., 1995).

**Actividad citotóxica y antitumoral.** El uso de sustancias líquénicas de especies de la familia *Parmeliaceae* como drogas anti-cancerígenas data de la década de 1960. Desde entonces, diversos extractos y compuestos aislados se han testado mayoritariamente frente a diversas líneas celulares cancerígenas y han demostrado un prometedor efecto antitumoral, antimutagénico y citotóxico, tal y como se recoge en las revisiones de Ingolfssdottir y col. (1997), y de Huneck (2001). Como ejemplos, los extractos acetónicos de *Evernia prunastri* y *Pseudevernia furfuracea* ejercieron, al igual que el ácido fisódico, un efecto citotóxico en las líneas celulares FemX (melanoma humano) y LS174 (carcinoma de colon humano), deteniendo el ciclo celular en la fase sub-G1 (Kosanic y col., 2013). El ácido protoliqueterínico aislado de *Cetraria islandica* inhibió el crecimiento de diversas líneas celulares cancerígenas (Ogmundsdottir y col., 1998). El ácido úsnico demostró actividades inhibitorias en el crecimiento y proliferación de dos líneas celulares de cáncer de mama (línea T-47D) y de cáncer de páncreas (Capan-2); su mecanismo de acción incluye la inhibición de la mitosis e inducción de la muerte celular por apoptosis (Einarsdottir y col., 2010). El dépsido ácido lecanórico, aislado de *Parmotrema tinctorum*, fue activo frente líneas celulares procedente de carcinoma de laringe (HEp-2), de mama (MCF7), de riñón (786-0) y de melanoma (B16-F10) (Bogo y col., 2010). Se ha investigado también el potencial anticancerígeno de diversos extractos y metabolitos mediante ciertos ensayos de citotoxicidad como el de *Artemia salina* (Boustie y Grube, 2005); algunos derivados del ácido lecanórico (Gomes y col., 2006) y extractos de especies como *Flavoparmelia cucullata* han demostrado notable citotoxicidad (Paudel y col., 2014).



**Actividad antiinflamatoria, analgésica y cicatrizante.** Diversos extractos y sustancias líquénicas presentan propiedades antiinflamatorias y antinociceptivas mediante la inhibición de enzimas relacionadas con estos procesos, como la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa (Gómez-Serranillos y col., 2014). Vijayakumar y col. (2000) demostraron en ratas que el (+)-ácido úsnico ejerce un efecto anti-inflamatorio significativo y dosis-dependiente, reduciendo el edema en la pata inducido por carragenina; ésto puede explicar los resultados obtenidos para un extracto (preparado con CO<sub>2</sub> supercrítico) de *Usnea barbata*, que contenía un 4 % de ácido úsnico y demostró una inhibición significativa de la COX-2 y la producción de prostaglandinas en otro modelo de inflamación (Engel y col., 2007). Investigaciones recientes revelaron un efecto anti-inflamatorio *in vivo* del extracto acuoso de *Cetraria islandica*, que mejoró la artritis inducida por albúmina sérica bovina en ratas, y cuyo efecto se relacionó con la presencia de liquenano (Freysdottir y col., 2008). Se desarrolló, incluso, un ensayo clínico que ha demostrado que una formulación a base de este liquen provoca una reducción directa de la inflamación y los cambios patológicos en la mucosa oral (Kempe y col., 1997). El extracto metanólico de *Pseudevernia furfuracea* también ha resultado poseer importantes efectos anti-inflamatorios, anti-nociceptivos y cicatrizantes, lo que se atribuyó a la presencia de ácido atrárico, metil-hematomato y metil-clorohematomato (Güvenç y col., 2012).

**Inhibición de enzimas.** Además de las enzimas relacionadas con la inflamación y nocicepción, se ha descrito para extractos y metabolitos líquénicos un efecto inhibitorio sobre otras enzimas metabólicas que sugiere potenciales aplicaciones terapéuticas. Por ejemplo, atranorina, ácido evérnico, ácido fisódico y ácido úsnico han demostrado actuar como potentes inibidores de enzimas relacionadas con el metabolismo de poliaminas, tales como arginasa, arginina y ornitina descarboxilasas, entre otras (Boustie y Grube, 2005; Kim y Cho, 2007). La inhibición de enzimas como xantina oxidasa (clave en la hiperuricemia) o tirosinasa (implicada en la síntesis de melanina) por ciertos extractos de líquenes demostró ser incluso superior a la de los compuestos de referencia usados en los ensayos (Behera y Makhija, 2004). Extractos de varias especies del género *Parmelia* demostraron un efecto inhibitorio sobre  $\alpha$  y  $\beta$ -glucosidasas y galactosidasas, enzimas determinantes en los niveles de glucosa postprandial (Lee y Kim, 2000; Patil y col., 2011). Por otra parte, el ácido protoliquesterínico (procedente de *Cetraria islandica*) es un potente inhibidor de la enzima 12(S)-lipoxigenasa presente en células plaquetarias, la cual juega un papel importante en la carcinogénesis, angiogénesis y metástasis (Bucar y col., 2004).

**Otras actividades.** Se han descrito propiedades gastroprotectoras, cardioprotectoras, hepatoprotectoras, anti-obesidad y anti-diabéticas para especies de *Parmeliaceae* (Gómez-Serranillos y col., 2014). Puede destacarse el efecto hipolipidémico y anti-obesidad demostrado *in vivo* por los extractos metanólico y acuoso de *Lethariella cladonioides*, que redujeron la expresión de genes adipogénicos (Sung y col., 2011; Wei y col., 2012). Extractos de *Parmotrema grayana* ejercieron un potente efecto hipoglicémico *in vivo* por vía oral (Rathnayake y col., 2010). Halici y col. (2005) demostraron un efecto gastro-protector para el extracto acuoso de *Usnea longissima* frente a las lesiones gástricas inducidas por indometacina, y posteriormente identificaron los ácidos difractaico y úsnico como posibles compuestos antiulcerogénicos en esta especie (Odabasoglu y col., 2006). En este sentido, el ácido protoliquesterínico también ha exhibido una potente actividad *in vitro* frente a *Helicobacter pylori* (Ingólfssdóttir y col., 1997). Por último, se ha descrito un remarcable efecto como protector cardiovascular para el extracto metanólico de *Usnea longissima*, por su actividad antitrombótica y antiplaquetaria (Lee y Kim, 2005).

#### 1.4.3. Actividades antioxidantes y neuroprotectoras

La capacidad antioxidante de las especies de líquenes de *Parmeliaceae* y sus metabolitos bioactivos es la propiedad que más directamente se relaciona con el potencial neuroprotector de los productos naturales (Kelsey y col., 2010) por lo que puede ser considerada la de mayor relevancia para el presente trabajo.

La naturaleza polifenólica de la mayoría de metabolitos secundarios de líquenes sugiere que pueden ejercer efectos antioxidantes frente a especies reactivas (Pandey y Rizvi, 2009). Diversas revisiones científicas señalan a los líquenes como fuentes interesante de productos naturales con capacidades antioxidantes (Boustie y Grube, 2005; Molnar and Farkas, 2010; Zambare y Cristopher, 2012). Se ha sugerido que los compuestos fenólicos sintetizados por la vía del polimalonato (depsidas y depsidonas) constituyen un mecanismo natural de defensa frente al estrés oxidativo en los propios líquenes (Hidalgo y col., 1994). Nuestro grupo de trabajo ha recogido todo el conocimiento existente hasta la fecha sobre las actividades antioxidantes de líquenes en una reciente publicación (Fernández-Moriano y col., 2016); en ella se incluyen estudios referentes a más de 75 especies liquénicas, de las cuales 31 pertenecen a la familia *Parmeliaceae*, y a más de 65 metabolitos aislados. La mayoría de la información procede de investigaciones *in vitro* y, principalmente, ensayos químicos que evalúan la capacidad de captación de radicales libres, inhibición de la peroxidación lipídica y el

poder reductor. Los trabajos a nivel de sustrato celular y en modelos animales son muy escasos y en su mayoría evalúan niveles de enzimas antioxidantes y otros marcadores de estrés oxidativo como los niveles de glutatión o la peroxidación tisular. Las siguientes Tablas 5 y 6 recogen, respectivamente, los estudios *in vitro* e *in vivo* más relevantes sobre capacidad antioxidante de líquenes parmeliáceos y sus metabolitos.

Se han publicado ciertos resultados prometedores en cuanto a la actividad antioxidante, destacando algunas especies y compuestos de líquenes de distintas familias, siendo los más numerosos los de *Parmeliaceae* (White y col., 2014; Fernández-Moriano y col., 2016). El metanol (entre otros disolventes orgánicos) se ha usado como el solvente más adecuado y eficiente para la extracción de compuestos con actividad antioxidante. Muchos estudios se han realizado, por tanto, sobre el extracto metanólico de diversos líquenes. Así, el extracto metanólico de *Cetraria islandica* demostró capacidad de revertir el estrés oxidativo generado por la aflatoxina B1 en linfocitos humanos en cultivo, promoviendo un aumento en la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) y una disminución en los niveles de malondialdehído (MDA) como marcador de peroxidación lipídica (Kotan y col., 2011). De forma similar, un extracto acuoso de esta especie inhibió en gran medida la peroxidación del ácido linoleico y presentó mayor actividad de captación de radicales libres que el  $\alpha$ -tocoferol, utilizado como antioxidante de referencia (Gülçin y col., 2002). Los extractos metanólico y acetónico de *Evernia prunastri* y *Pseudevernia furfuracea* evidenciaron un potencial antioxidante interesante en los ensayos de captación de radicales DPPH y superóxido, que se atribuyó a la presencia de un alto contenido en polifenoles (Mitrovic y col., 2011; Kosanic y col., 2013). Por otro lado, el extracto metanólico de *Usnea ghattensis* también mostró una buena actividad antioxidante en términos de inhibición de peroxidación lipídica y captación de radicales libres (Behera y col., 2005).

En estrecha relación con la actividad antioxidante, el potencial de los metabolitos de líquenes como posibles agentes neuroprotectores es mayoritariamente desconocido. Algunos trabajos han evaluado los efectos sobre el sistema nervioso central (SNC) para algunos polisacáridos (metabolitos primarios) de líquenes. Por ejemplo, la administración oral de isoliquenano a roedores (alfa-glucano de *Cetraria islandica*) revirtió el deterioro en la adquisición de memoria debido a la ingesta de etanol y atenuó los déficits de memoria espacial provocados por la exposición al péptido beta-amiloide (Smriga y col., 1999). Otros alfa-glucanos de *Parmelia caperata* y *Flavoparmelia baltimorensis* favorecieron la plasticidad sináptica en modelos *in vivo* (Nelson y col., 2012).

Respecto a los metabolitos secundarios, son muy recientes las primeras aproximaciones a su potencial efecto neuroprotector en el SNC (algunos trabajos se reflejan en la Tabla 5). El estudio de De Paz y col. (2010b) demostró que ciertos poliquétidos como los ácidos estíctico, salazínico y úsnico presentan un interesante efecto antioxidante en una línea celular utilizada como modelo de astrogliá (U373-MG) y sometida a estrés oxidativo, aumentando su viabilidad celular. Rabelo y col. (2012) demostraron ciertos efectos pro-oxidantes para el ácido úsnico según las condiciones de los ensayos, lo que evidencia la necesidad de más estudios para dilucidar con exactitud su potencial antioxidante. Del mismo modo, la depsida atranorina demostró un efecto citoprotector en la línea celular SH-SY5Y (modelo de astrocitoma humano) frente al estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; ejerce efectos diferenciales frente a la producción de distintas especies reactivas, actuando como pro-oxidante bajo ciertas condiciones experimentales (Melo y col., 2011).

Luo y col. (2013) abordaron por primera vez la búsqueda en líquenes de compuestos secundarios con aplicación terapéutica frente a la enfermedad de Alzheimer. Mediante un *screening* de bioactividad en 109 extractos liquénicos, identificaron en un extracto de *Cladonia macilenta* un compuesto activo: la biruloquinona (previamente aislado en *Parmelia birulae*, de *Parmeliaceae*); este compuesto actúa como un potente inhibidor de acetilcolinesterasa y demostró un interesante efecto citoprotector en células PC12 (modelo neuronal) frente a la toxicidad ejercida por el péptido Aβ<sub>25-35</sub> y frente a estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sugiriendo que puede desarrollarse como un agente multi-funcional en la terapia del Alzheimer. En esta línea, nuestro grupo ha publicado resultados interesantes para varios líquenes parmeliáceos frente al estrés oxidativo en modelos celulares de SNC (se incluyen *Cetraria islandica*, *Vulpicida canadensis*, *Cetrelia braunsiana*, *Parmotrema saccatilobum* y *Usnea ghattensis*), así como la identificación de sus principales compuestos bioactivos (Fernández-Moriano y col., 2015a; Fernández-Moriano y col., 2015b). Por último, el reciente estudio de Reddy y col. (2016) ha demostrado el potencial de los metabolitos liquénicos en el SNC, al revelar las propiedades neuroactivas de atranorina, ácido perlatórico y ácido fisódico; estos poliquétidos ejercen propiedades neurotróficas, neurogénicas e inhibitorias de acetilcolinesterasa *in vitro* (en células Neuro2A) y *ex vivo* (en células madre primarias). Ante estas evidencias y la necesidad de descubrir nuevos agentes activos frente a las enfermedades neurodegenerativas, los líquenes emergen como prometedoras fuentes de compuestos con actividad antioxidante y potenciales aplicaciones terapéuticas.

Especie / Compuesto aislado	Solvente / Origen	Línea celular	Inhibición de peroxidación lipídica	Marcadores de actividad antioxidante	Referencia
Atranorina	Comercial	Línea celular SH-SY5Y (modelo de neuronas humanas)	↑ Peroxidación lipídica inducida por radicales peroxilo <i>in vitro</i>	Buena capacidad antioxidante en ensayos de TRAP ( <i>total reactive antioxidant potential</i> ) y TAR ( <i>total antioxidant potential</i> ) ↑ Producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y NO, y la actividad captadora del radical O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> ↑ Protección de las células SH-SY5Y frente a la reducción de viabilidad celular inducida por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	Melo y col., 2011
<i>Cetraria islandica</i> (L.) Ach.	Metanol	Linfocitos humanos	↓ Niveles de MDA	↑ Actividad de las enzimas SOD y GPx	Kotan y col., 2011
Ácido difractaico	<i>Protousnea magellanica</i> (Mont.) Krog	Células HeLa (procedentes de cáncer cérvico-uterino humano)	No estudiado	Sin efecto significativo en los niveles intracelulares de ERO No ejerce protección frente al aumento intracelular de ERO inducido por t-BHP	Brisdelli y col., 2013
<i>Evernia prunastri</i> (L.) Ach.	Metanol	Linfocitos humanos	↓ Niveles de MDA	↑ Actividad de las enzimas SOD y GPx, y los niveles de GSH	Alpsoy y col., 2013
Ácido estictico	<i>Xanthoparmelia conspersa</i> (Ach.) Hale [extracto metanólico]	Línea celular U373-MG (derivada de astrocitoma humano)	No estudiado	↑ Viabilidad celular en células tratadas con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ↓ Producción de ERO Valor ORAC: 2,3 µmol TE/mg	De Paz y col., 2010b
Ácido salazínico	<i>Xanthoparmelia cantschadalis</i> (Ach.) Hale [extracto metanólico]	Línea celular U373-MG (derivada de astrocitoma humano)	No estudiado	↑ Viabilidad celular en células tratadas con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ↓ Producción de ERO Valor ORAC: 2,7 µmol TE/mg	De Paz y col., 2010b
Ácido úsnico	<i>Xanthoparmelia conspersa</i> (Ach.) Hale <i>X. cantschadalis</i> (Ach.) Hale [extracto metanólico]	Línea celular U373-MG (derivada de astrocitoma humano)	No estudiado	↑ Viabilidad celular en células tratadas con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ↓ Producción de ERO Valor ORAC: 2,9 µmol TE/mg	De Paz y col., 2010b
	Comercial	Línea celular SH-SY5Y modelo de neuronas humanas	↑ Lipoperoxidación	Buena capacidad antioxidante en ensayos de TRAP ( <i>total reactive antioxidant potential</i> ) y TAR ( <i>total antioxidant potential</i> ). ↓ Formación de OH <sup>•</sup> y NO Sin efecto en las actividades tipo CAT y SOD No protege frente a la muerte celular inducida por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ↑ Producción de ERO intracelulares	Rabelo y col., 2011
<i>Xanthoparmelia cantschadalis</i> (Ach.) Hale y <i>X. conspersa</i> (Ach.) Hale	Metanol	Línea celular U373-MG (derivada de astrocitoma humano)	No estudiado	↑ Viabilidad celular en células tratadas con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ↓ Producción de ERO Valores ORAC: 4,9 y 8,8 µmol TE/mg	De Paz y col., 2010b
<i>Xanthoria elegans</i> (Link) Th. Fr.	Extracto acuoso	Linfocitos humanos	No estudiado	↑ TAC ( <i>total antioxidant capacity</i> ) sin modificar el nivel de TOS ( <i>total oxidant status</i> )	Turkez y col., 2011

Tabla 5. Estudios en cultivos celulares *in vitro* sobre propiedades antioxidantes de líquenes parmeliáceos (Fernández-Moriano y col., 2016).

Especie / Compuesto aislado	Solvente / Origen	Modelo de estudio	Inhibición de peroxidación lipídica	Enzimas antioxidantes y otros marcadores de actividad antioxidante	Referencia
<i>Cetraria islandica</i> (L.) Ach.	-	Ratas Wistar (muestra: sangre)	↓ Niveles de MDA	↑ Niveles de GSG ↓ Actividades de CAT y GPx Su asociación con magnesio aumenta el efecto antioxidante	Cernescu y col., 2011
Ácido difractaico	<i>Usnea longissima</i> Ach. [extracto en dietiléter]	Ratas Wistar (muestra: tejido estomacal)	↓ Niveles de lipoperoxidación en tejidos	↑ Actividades de SOD y GPx, y los niveles de GSH ↓ Actividades de CAT y MPx ↑ Actividad de cNOS y ↓ actividad de iNOS	Bayir y col., 2006
Ácido fumarprotocetrárico	<i>Cladonia verticillaris</i> (Raddi) Fr. [extracto acetónico]	Ratones Swiss Webster (muestra: tráquea y pulmones)	↓ Peroxidación lipídica inducida por endotoxina	No estudiado	de Barros Alves y col., 2014
<i>Lobaria pulmonaria</i> (L.) Hoffm.	Metanol	Ratas Wistar (muestra: tejido estomacal)	↓ Niveles de lipoperoxidación en tejidos	↑ Actividades de SOD y GPx, y los niveles de GSH en tejidos Sin efecto en los niveles de CAT y MPx	Karakus y col., 2009
<i>Peltigera rufescens</i> (Weiss) Humb.	Metanol	Ratas Sprague-Dawley (muestra: tejido estomacal)	↓ Niveles de lipoperoxidación	↑ Niveles de SOD, CAT, GSH, GR y GPx ↓ Actividades de MPx y iNOS	Tanas y col., 2010
<i>Usnea ghattensis</i> G. Awasthi	Metanol	Ratones Swiss Webster (muestra: tejido hepático)	↓ Formación de MDA en tejido hepático	Depleción de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx) y de GSH	Verma y col., 2008
<i>Usnea longissima</i> Ach.	Extracto acuoso	Ratas Wistar (muestra: tejido estomacal)	47,1% inhibición	↑ Niveles de SOD y GST ↓ Actividad CAT Poder reductor (A <sub>700</sub> ): 0,1 Contenido fenólico: 18,3 mg ácido gálico / g	Halici y col., 2005
Ácido úsnico	<i>Usnea longissima</i> Ach. [extracto en dietiléter]	Ratas Wistar (muestra: tejido estomacal)	↓ Niveles de lipoperoxidación en tejidos	↑ Niveles de SOD, GSH y GPx ↓ Actividades de CAT, GR y MPx ↑ Actividad de cNOS y ↓ actividad de iNOS	Odabasoglu y col., 2006

Tabla 6. Estudios *in vivo* que evalúan parámetros sobre propiedades antioxidantes de líquenes. Se incluyen todos los trabajos existentes, incluso aquéllos relacionados con líquenes no parmeliáceos (Fernández-Moriano y col., 2016).

## 2. ESTRÉS OXIDATIVO Y NEURODEGENERACIÓN

### 2.1. Sistema Nervioso Central

#### 2.1.1. Características generales

El sistema nervioso se entiende como una red compleja de estructuras especializadas cuya misión es más compleja aún: controlar y regular el funcionamiento de los diversos órganos y sistemas, y coordinar la interrelación del organismo con el medio externo. Se organiza de modo que detecta cambios en los medios internos y externos y evalúa la información para responder de forma adecuada a través de cambios en músculos y glándulas. De forma general, se divide en sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP) (Nieuwenhuys y col., 2009).

El SNC está formado por el encéfalo y la médula espinal. Mientras que el encéfalo es la parte del SNC contenida dentro del cráneo (cerebro, cerebelo y tronco encefálico), la médula espinal se sitúa dentro del canal vertebral y se comunica por la parte occipital del cráneo con el encéfalo. El SNC es el encargado de recibir, integrar y correlacionar los distintos tipos de información sensorial, y donde se asientan los centros de la memoria y de los movimientos voluntarios. Aunque la degeneración debida a enfermedades neurodegenerativas (asociadas o no a la edad) afecta a todas las células nerviosas del organismo, las principales alteraciones en estructura y función se producen en las células del SNC (Peden y Ironside, 2012).

#### 2.1.2. Unidades funcionales

El SNC comprende dos tipos básicos de estructuras funcionales (Figura 7):

- **Neuronas:** constituyen la unidad funcional básica. Son las encargadas de la transmisión del impulso nervioso, permitiendo las funciones de recogida y procesado de la información y la generación de respuestas adecuadas, conectando, además, áreas distantes del organismo. El cerebro adulto contiene entre  $10^{11}$  y  $10^{12}$  neuronas, todas ellas constituidas además de por cuerpo celular (citoplasma y núcleo), por axón y dendritas, que son proyecciones de la célula que permiten la inter-conexión con otras neuronas mediante señales eléctricas y químicas (Pavelka y Roth, 2010). Desde que Ramón y Cajal desarrollara la “Doctrina de la neurona” a

finales del siglo XIX (Sabbatini, 2003), su estructura y función ha sido muy estudiadas por ser la clave de todos los procesos nerviosos del organismo (Lodish y col., 2010).

▪ **Células de la glía:** se trata de células conjuntivas estrelladas que rodean a las neuronas y superan a éstas en 5-10 veces su número. Se clasifican en dos grandes grupos: la microglía (constituyen el sistema inmune cerebral) y la macroglía (oligodendrocitos y astrocitos). Los oligodendrocitos se encargan de la mielinización de los axones neuronales del SNC. Por su parte, los astrocitos son las células gliales más grandes y más numerosas (hasta el 40%) de todo el SNC (Barres, 2003; Jessen, 2004).

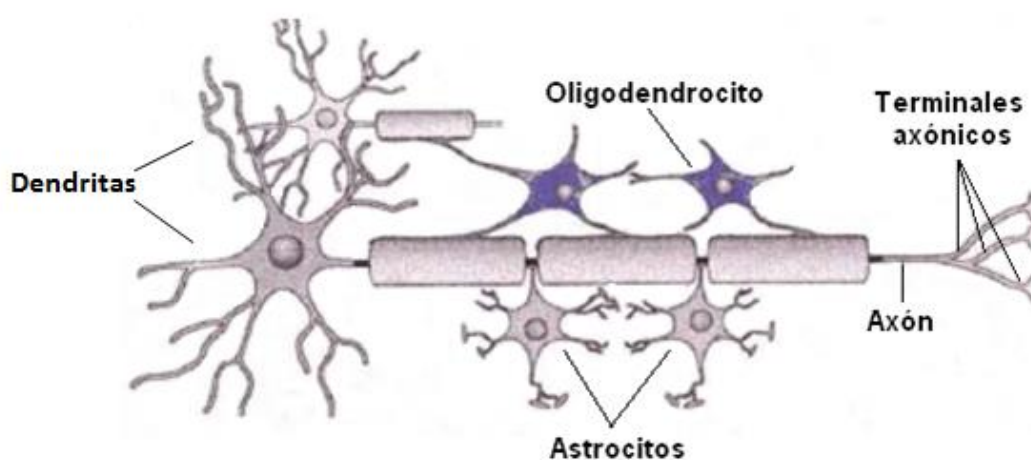


Figura 7. Dibujo esquemático representativo de las principales unidades funcionales del SNC.

Tradicionalmente, se ha considerado que las células gliales, y los astrocitos en particular, ejercían una función de mero soporte estructural hacia las neuronas, pero en los últimos años se ha descubierto que, además de la protección física, aseguran el correcto funcionamiento del SNC (Guillamón-Vivancos y col., 2015). Presentes en las terminaciones sinápticas y los nódulos de Ranvier, los astrocitos juegan un papel muy importante en condiciones fisiológicas a través de su participación en los siguientes procesos:

- Control de la transmisión sináptica. Los mediadores liberados por la terminal presináptica activan, además de a la neurona postsináptica, a los astrocitos circundantes, que se excitan y liberan los llamados “gliotransmisores” (p. ej., glutamato, ATP, etc.), regulando la respuesta al estímulo neuronal (Fellin y col., 2004).
- Energía y metabolismo del SNC. Los astrocitos captan glucosa de la circulación y proporcionan a las neuronas metabolitos energéticos; de hecho, constituyen la principal



reserva de glucógeno en el SNC (Brown y Ransom, 2007). Están implicados en los procesos de síntesis y catabolismo de aminoácidos, por expresar algunas enzimas que no están presentes en neuronas, tales como la piruvato carboxilasa o la glutamina sintetasa (clave para prevenir la excitotoxicidad por glutamato) (Papageorgiou y col., 2011). Están directamente involucrados en el metabolismo de lípidos y la secreción de lipoproteínas (como la ApoE) que ejercen diversos efectos a nivel cerebral (Gee y Keller, 2005). Además, los astrocitos aportan a las neuronas precursores necesarios para la síntesis del antioxidante glutatión, como glutamina y cisteinilglicina (Dringen y col., 1999).

- Desarrollo y plasticidad del SNC. Cabe destacar, por ejemplo, que los axones en crecimiento son guiados hacia sus dianas mediante moléculas derivadas de astrocitos, como tenascina C y proteoglicanos (Powell y Geller, 1999). Los astrocitos también participan en la sinaptogénesis.

- Regulación del flujo sanguíneo y del trofismo del SNC. Los astrocitos acoplan los cambios de la microcirculación cerebral a la actividad neuronal. Las señales neuronales inducen oleadas de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos, que liberan mediadores (p. ej., prostaglandina E, NO, ácido araquidónico, etc.) con efectos vasodilatadores o vasoconstrictores (Metea y Newman, 2006; Gordon y col., 2007). Además, regulan el pH extracelular y se encargan de la homeostasis hídrica y de iones (Navarrete y col., 2012).

- Neurogénesis. En los primeros meses de vida, los astrocitos están involucrados en la migración de las células madre neurales hasta el bulbo olfatorio y corteza prefrontal, donde se diferencian a ciertos tipos de neuronas. Producen factores de crecimiento y neurotróficos esenciales para la supervivencia de las neuronas (Sanai y col., 2011).

- Regulación de ritmos circadianos. Vía adenosina, los astrocitos se comunican con las neuronas implicándose en la homeostasis del sueño y efectos cognitivos; así, la inhibición de la “gliotransmisión” previene el déficit cognitivo asociado a la privación del sueño (Halassa y col., 2009).

Éstas y otras funciones, como la participación en la formación de la barrera hematoencefálica (BHE), ponen en evidencia la influencia de las células de la macroglía en la regulación de la función neuronal (Abbott y col., 2006; Tasker y col., 2012). Este estrecho vínculo hace que alteraciones en la función astrocitaria puedan contribuir o desencadenar enfermedades del SNC, como las enfermedades neurodegenerativas, donde acontece una muerte neuronal progresiva. Por ello, en los modelos de estudio de enfermedades neurodegenerativas resulta interesante evaluar la implicación de ambos tipos celulares.

### 2.1.3. La barrera hematoencefálica (BHE)

La BHE constituye una unidad estructural y funcional clave en el SNC de mamíferos, ya que regula el transporte de compuestos entre la sangre y el SNC. Su existencia se conoce desde los trabajos iniciales de Erlich y Goldman realizados en animales empleando colorantes para analizar la tinción selectiva del tejido cerebral (Moody, 2006). En la actualidad se diferencian tres tipos de barreras hemáticas según los tipos celulares y la zona anatómica: la barrera hematoencefálica propiamente dicha, la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo y la barrera sangre-aracnoides. Éstas son barreras físicas que separan la sangre del SNC, protegiendo a éste frente a sustancias endógenas y xenobióticos que pueden resultar tóxicos. Sin duda, la BHE es la más importante en la regulación de la entrada/salida de compuestos del SNC, por presentar una elevada superficie de intercambio (12-18 m<sup>2</sup> en un humano adulto) (Abbott y col., 2010).

La BHE se constituye por las células del endotelio vascular de los capilares cerebrales y por una membrana basal continua a la que se adosan los pericitos; también se encuentra en contacto directo con prolongaciones de astrocitos que se comunican con las neuronas próximas (Figura 8). El endotelio de la BHE está modificado, y las células endoteliales que lo conforman expresan caracteres especiales: presentan uniones estrechas ("*tight junctions*" y "*adherens junctions*"), ausencia de fenestraciones y presencia de transportadores que regulan el paso en ambos sentidos de moléculas como O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y glucosa al interior cerebral y excluyen aquellos que pudieran alterar la normal función (por ser neurotóxicos) o la osmolaridad del SNC. El endotelio capilar cerebral es unas 50-100 veces más estrecho que el presente en otros capilares periféricos, por lo que presenta escasa actividad pinocítica (de captación de moléculas solubles extracelulares en vesículas endocíticas por invaginación de la membrana) (Huber y col., 2001; Bernacki y col., 2008). La BHE funciona, por tanto, como una barrera física con elevada resistencia transendotelial, hasta 2000  $\Omega \times \text{cm}^2$ , que dificulta sobremanera el transporte paracelular (por espacios intercelulares) bidireccional de compuestos. Por otro lado, la presencia de un alto contenido en mitocondrias sugiere que la energía obtenida se utiliza para el transporte activo de moléculas hacia/desde el encéfalo (de Boer y Gaillard, 2007; Johanson y col., 2011). Además, las células endoteliales de la BHE presentan niveles elevados de sistemas enzimáticos tales como fosfatasa alcalina, monoaminoxidasas y L-aminoácidos descarboxilasas, entre otras. Éstas metabolizan ciertos compuestos y reducen sus niveles en el SNC, siendo relevantes en el metabolismo de fármacos que cruzan la BHE hacia el cerebro, como los opiáceos, incluyendo la codeína o la L-Dopa (Hawkins y col., 2006; Tajés y col., 2014).

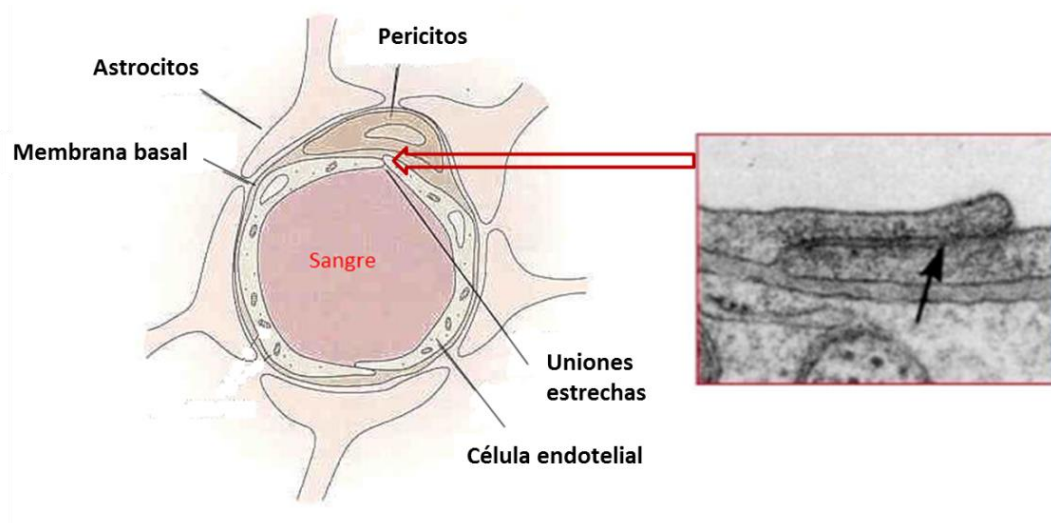


Figura 8. Estructura de la BHE. Se representan las principales unidades que la constituyen y se muestra además una fotografía microscópica que ilustra las uniones estrechas entre las células endoteliales.

Desde el punto de vista farmacológico, la función más interesante de la BHE es la relacionada con el transporte de sustancias hacia (o desde) el SNC, que puede darse por varias vías (Tajes y col., 2014):

- **Transporte paracelular:** movimiento por difusión pasiva de solutos lipofílicos o de bajo peso molecular (p. ej., manitol, fluoresceína, etc.) a través de la BHE, mediado por el citoesqueleto endotelial y las *tight junctions*, que es dependiente del gradiente electroquímico y osmótico. Juega un papel menor en el transporte de fármacos hacia el cerebro (Orthmann y col., 2011).
- **Transporte transcelular:** es el más frecuentemente utilizado por compuestos con actividad a nivel del SNC. Puede ser dependiente o no de energía, e implica la difusión a través de las membranas apical (luminal) y basal (aluminal) de las células endoteliales. Pueden transportarse así moléculas gaseosas ( $O_2$  y  $CO_2$ ) y liposolubles (nicotina o etanol). Este tipo de transporte y el anterior se ven muy limitados por un balance adecuado de propiedades físico-químicas de las moléculas, entre las que destacan: la lipofilia (como norma general, debe ser elevada), el peso molecular ( $< 600$  Da) y la capacidad de ionización (una molécula cargada no puede atravesar la BHE por este tipo de transporte) (Mensch y col., 2009).
- **Transporte de entrada mediado por proteínas receptoras:** es un transporte activo dependiente de temperatura en el que el reconocimiento receptor-ligando promueve la captación y formación de vesículas endocíticas que, tras fusionarse con la membrana de la parte aluminal, liberan el contenido por exocitosis. Algunas vesículas no atraviesan con éxito la BHE sino que se unen a lisosomas y su contenido es hidrolizado. Es el principal mecanismo

para acceder al SNC usado por hormonas o proteínas de alto peso molecular, tales como insulina, leptina e IGF, entre otras (Holly y Perks, 2006). En los últimos años, se ha considerado como diana para la administración de fármacos al SNC, al ser un transporte muy específico y no limitado por el tamaño o lipofilia de la molécula.

- **Transporte de eflujo o salida:** transporte activo que elimina del SNC ciertos compuestos y los transfiere a la circulación sistémica, para evitar su acumulación. Aunque hay varios, el transportador prototipo es la glicoproteína-P que, presente en alta densidad en la membrana luminal de la célula endotelial, actúa como una bomba dependiente de ATP y elimina del cerebro numerosos xenobióticos hidrofóbicos (previniendo su acumulación y protegiendo la viabilidad neuronal), pero también fármacos, entre los que se incluyen los anticancerígenos, inmunosupresores y antibióticos (Lin y Yamazaki, 2003). Así, algunos fármacos capaces de atravesar la BHE no consiguen alcanzar concentraciones terapéuticas porque son expulsados del parénquima cerebral a la circulación sanguínea: es un mecanismo de multirresistencia (Sun y col., 2004).

- **Transcitosis:** puede ser mediada por adsorción o a través de *carriers*/portadores, siendo esta última la más relevante. El transporte mediado por *carriers* es saturable y puede ser dependiente o independiente de energía. Los transportadores suelen estar polarizados y situados en ambas caras de la membrana de la célula endotelial. Son muy diversos y facilitan el paso al SNC de moléculas concretas, como los GLUT-1 que transportan pasivamente la glucosa o los transportadores activos selectivos para los tipos de aminoácidos (p. ej., sistemas N- y L- para el transporte de aminoácidos pequeños neutros, sistema ACS para los que contienen azufre, etc.) (Preston y col., 2014).

La integridad anatómico-funcional de la BHE es clave para el correcto funcionamiento del SNC. Una disrupción de su uniformidad en condiciones patológicas (incluyendo infecciones e inflamación secundaria) y cambios en la permeabilidad de las membranas desencadenan extravasación de fluido al SNC que provoca edema cerebral y graves consecuencias (Stamatovic y col., 2008; Marques y col., 2013). En condiciones fisiológicas, se estima que la permeabilidad de la BHE restringe el paso de la sangre al cerebro de aproximadamente un 98% de las moléculas de pequeño tamaño; y prácticamente el 100% de las grandes moléculas (proteínas recombinantes, anticuerpos monoclonales y péptidos), activas frente a los trastornos del SNC, no atraviesan la BHE (Gabathuler, 2010).

Así pues, uno de los principales inconvenientes en el desarrollo de fármacos dirigidos al tratamiento de enfermedades neurodegenerativas consiste en alcanzar su diana terapéutica,

ya que para ello debe atravesar la BHE, que determina y limita su distribución en SNC. Para solventar este problema, se han desarrollado distintas técnicas de administración de fármacos en el SNC (Tajes y col., 2014):

- **Técnicas invasivas:** incluyen el choque hiperosmótico, la disrupción bioquímica con agentes vasoactivos o alquilglicerol, los ultrasonidos, el uso de microchips o la infusión intracerebroventricular. El riesgo de infecciones, cambios patológicos y otras desventajas hacen que la investigación actual se enfoque hacia el siguiente grupo de técnicas.

- **Técnicas no invasivas:** se han propuesto modificaciones químicas de moléculas con el objetivo de aumentar la lipofilia y permeabilidad a través de BHE; la administración intranasal de fármacos a través de las neuronas sensitivas olfativas; el uso de micropartículas biodegradables que engloban a la molécula activa; y la combinación de la molécula con otras moléculas que sí son capaces de cruzar la BHE (p. ej., péptidos catiónicos pequeños) (Czeisler y Janigro, 2006; Miyake y col., 2015).

Las investigaciones futuras van dirigidas a reducir los inconvenientes que se derivan del empleo de técnicas no invasivas para la administración de fármacos a nivel del SNC, tales como los relacionados con la biodisponibilidad, los efectos secundarios y la pérdida de actividad de la molécula en el SNC. Para ello, se están utilizando en las etapas iniciales modelos *in vitro* de BHE, por su menor coste y las consideraciones éticas que presenta el uso de modelos *in vivo*. Así, se han empleado en los últimos años modelos de co-cultivo entre células endoteliales y gliales (González-Burgos y col., 2013a; Bocsik y col., 2015). Muy recientemente, la línea celular hCMEC/D3 ha surgido como un modelo muy apropiado para la investigación farmacológica, con propiedades que mimetizan las características funcionales y estructurales del endotelio de la BHE: uniones celulares estrechas, permeabilidad selectiva, expresión de transportadores específicos y mantenimiento de una elevada TEER (Wesker y col., 2013; Papadia y col., 2016).

## 2.2. Estrés oxidativo

### 2.2.1. Concepto

El término “**estrés oxidativo**” (EO) hace referencia a un desequilibrio entre la producción de especies reactivas (ER) y las defensas antioxidantes a nivel celular (Halliwell, 2006). Hace ya tres décadas, Sies lo definía como una “alteración en el balance pro-oxidante/antioxidante a favor del primero, que lleva a un potencial daño” (Sies, 1985).

Se incluyen en esa definición otros términos relevantes. **Antioxidante** se ha definido como “cualquier sustancia que, presente a baja concentración en relación a la de un sustrato oxidable, previene la oxidación de dicho sustrato” (Halliwell y Gutteridge, 1995). Esta definición ha sido reformulada de forma más correcta como “cualquier sustancia que retrasa, previene o elimina daño oxidativo de una diana molecular”. De este modo, se engloban en ella moléculas con actividad antioxidante tales como la albúmina del plasma que, presente en mayor concentración que los iones de cobre, se unen a éstos y evitan la oxidación de sustratos como las lipoproteínas de baja densidad (LDLs); y también se incluyen las chaperonas como sistemas de reparación de moléculas de ADN dañadas por oxidación, y ciertos inhibidores de la generación de ER, ya que todos ellos tienen como efecto último el prevenir el daño oxidativo (Halliwell y Gutteridge, 2007). Por otra parte, el **daño oxidativo** ha sido definido como “el daño biomolecular causado por el ataque de especies reactivas a los constituyentes de los organismos vivos” (Halliwell y Whiteman, 2004). Más adelante se revisarán las implicaciones a nivel celular del daño oxidativo.

El desequilibrio que lleva al EO puede deberse bien a una excesiva generación de especies pro-oxidantes (aumento de su producción o disminución de su eliminación mediante sistemas de defensa), así como a defectos en la reparación de los daños oxidativos producidos en las células por estar las defensas antioxidantes disminuidas o desbordadas. El daño oxidativo está presente en numerosos procesos patológicos (Figura 9) (Halliwell, 2006; Sosa y col., 2013).

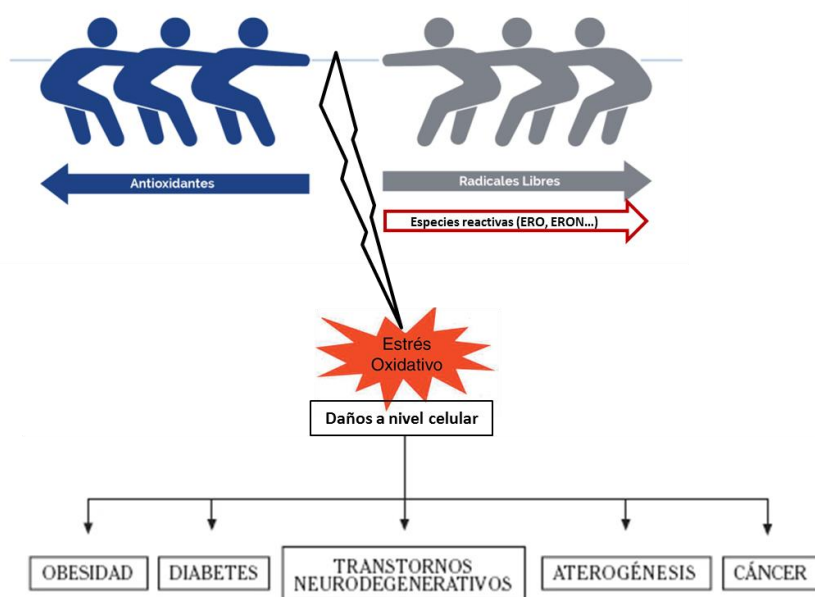


Figura 9. El desequilibrio entre especies pro-oxidantes y antioxidantes, a favor de las primeras, conduce al EO y al daño celular que ello implica, el cual está presente en muchas patologías humanas.

### 2.2.2. Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)

Las **especies reactivas** (ER) se forman como productos del metabolismo de **radicales libres** (RL) y, aunque no todas son RL, sí son moléculas que actúan como pro-oxidantes a nivel celular y se transforman en RL con cierta facilidad. Bajo el término de ER, se incluyen las especies reactivas de oxígeno (ERO), las de hierro (ERH), las de cobre (ERC) y las de nitrógeno (ERN). RL hace referencia a aquellas especies químicas que presentan un electrón desapareado en su estructura y que les confiere una elevada e inespecífica reactividad. A pesar de tener una vida media muy corta (hasta del orden de nanosegundos), son capaces de difundir por los compartimentos celulares y atacar diversas biomoléculas. Se generan por pérdida o ganancia de un electrón o por ruptura homolítica de un enlace, como consecuencia del efecto de radiaciones u otras moléculas iniciadoras (Valko y col., 2007). Las ER que no lo son, pueden convertirse en RL con facilidad mediante reacciones catalizadas por metales de transición (p. ej., Cu y Fe) y a través de las conocidas fases de la reacción en cadena: iniciación, propagación y terminación (Gilbert y col., 1999). Debido a su mayor importancia a nivel celular en las situaciones de EO, nos centraremos en este apartado en las ERO.

Bajo el término de **especies reactivas de oxígeno** (ERO) se engloban toda una serie de especies químicas derivadas del  $O_2$  molecular, pero que presentan una reactividad mucho mayor que la de este elemento en su estado basal. Entre ellas, se incluyen iones de oxígeno como oxígeno atómico (O), ozono ( $O_3$ ) y oxígeno singlete ( $^1O_2$ ); peróxidos como peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y peroxinitrito ( $ONOO^-$ ); y RL como radical hidroxilo ( $OH^\bullet$ ), radical superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ), radical alcoxilo ( $RO^\bullet$ ) y radical peroxilo ( $ROO^\bullet$ ) (D'Autreaux y Toledano, 2007).

La generación de ERO es una consecuencia intrínseca al metabolismo aerobio. Las ventajas evolutivas introducidas con los eficientes sistemas de obtención de energía (ATP) mediante la oxidación de moléculas de glucosa utilizando el oxígeno como aceptor de electrones, trajo como efecto colateral la generación excesiva de ERO y RL. Ésto a su vez indujo la aparición de sistemas de defensa antioxidantes intra y extracelulares, tanto enzimáticos como no enzimáticos, con el fin de mantener el equilibrio redox (Dorado y col., 2003). En todos los procesos metabólicos de la célula se producen pequeñas cantidades de RL, como ocurre por ejemplo en el retículo endoplasmático y los peroxisomas, pero sin duda la fuente endógena de ERO más importante es el sistema mitocondrial de transporte electrónico, al ser estas ERO productos secundarios del metabolismo oxidativo (Zorov y col., 2014).

Cuando las ERO (como el radical  $O_2^{\bullet-}$  y el  $H_2O_2$ ) están presentes en condiciones fisiológicas no generan daño oxidativo, ya que son compensadas por las defensas antioxidantes intrínsecas de la célula, sino que además actúan como señalizadores moleculares muy importantes: son segundos mensajeros en procesos celulares tan importantes como la transducción de señales, la regulación de la expresión génica, la proliferación y diferenciación celular, la activación/inhibición enzimática, la apoptosis, la regulación de la respuesta inmune o la autofagia (McCord, 2000; Dan Dunn y col., 2015). Su implicación en procesos patológicos tiene lugar cuando son producidas en niveles que no pueden ser contrarrestados por los sistemas antioxidantes de la célula. En esa situación, cabe destacar que fuentes exógenas tales como el humo del tabaco, la radiación solar y ciertos fármacos (p. ej., halotano, paracetamol, etc.), contribuyen a la sobreproducción de ERO (Beckman y Ames, 1998; Phaniendra y col., 2015).

En la Tabla 7 se recogen las principales ERO, así como las principales reacciones intracelulares que las originan. Por su relevancia en la homeostasis celular y fisiopatología, pueden destacarse las siguientes:

- Anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ): es la ERO más abundante a pH fisiológico, al generarse como subproducto de la respiración celular en la mitocondria. No ejerce un efecto directo sobre biomoléculas, pero a niveles elevados es capaz de movilizar iones de hierro desde la ferritina e inactivar enzimas que contienen hierro en su centro activo, como la aconitasa. Se considera como la ERO primaria, ya que interacciona con otras moléculas generando ERO secundarias (Kovacic y col., 2005).
- Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ): puede generarse a partir de la dismutación del anión superóxido. No es un RL, y por tanto, menos reactivo hacia las biomoléculas; pero en presencia de iones de hierro se descompone dando lugar al radical hidroxilo, que es la principal causa de su toxicidad. Al no tener carga, es capaz de difundir a través de membranas biológicas a bajas concentraciones, e interviene en procesos fisiológicos importantes como la inflamación y la proliferación/diferenciación celular (Veal y col., 2007).
- Radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ): es el RL más reactivo y tóxico, por su capacidad de reaccionar con todas las biomoléculas. Se genera a partir del  $H_2O_2$  en presencia de iones hierro (reacción de Fenton). Sus principales efectos se deben a su interacción con las bases púricas y pirimídicas y los residuos de desoxirribosa presentes en el ADN, generando productos mutagénicos como la glicol-citosina, 8-hidroxiadenina y 8-hidroxiguanina. Es capaz de iniciar la reacción en cadena



de la peroxidación lipídica, dando lugar a la formación final de aldehídos reactivos tóxicos, como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal (4-HNE) (Halliwell, 2001; Lipinski, 2011).

- Óxido nítrico (**NO**): es un RL poco reactivo (en comparación con otros como el hidroxilo) pero que ejerce funciones muy importantes en la vaso-regulación y neurotransmisión a nivel cerebral. En exceso, el NO puede inhibir la citocromo oxidasa mitocondrial, generando la fuga de electrones y una mayor generación de  $O_2^{\bullet-}$ . Además, el NO reacciona con  $O_2^{\bullet-}$  generando peroxinitritos que *in vivo* generan la oxidación y nitración de lípidos, ADN y residuos aminoacídicos (Beckman y Koppenol, 1996; Omanwar y Fahim, 2015).

Especies Reactivas de Oxígeno	Reacción más común que los origina
$O_2^{\bullet-}$ Radical superóxido	$NADPH + 2 O_2 \rightarrow NADPH^+ + H^+ + 2 O_2^{\bullet-}$
$OH^{\bullet}$ Radical hidroxilo	$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^-$
$ROO^{\bullet}$ Radical peroxilo	$L^{\bullet} + H_2O \rightarrow LH + RO_2^{\bullet}$
$RO^{\bullet}$ Radical alcoxilo o fenoxilo	$R^{\bullet} + O_2 \rightarrow RO^{\bullet}$
$L^{\bullet}$ Radical peróxido lípido	$LO_2^{\bullet} + LH \rightarrow LOOH + L^{\bullet}$
$^{\bullet}NO_2$ Peróxidos de óxido nítrico	$NO + O_2^{\bullet-} \rightarrow ^{\bullet}NO_2$
$H_2O_2$ Peróxido de hidrógeno	$2 O_2^{\bullet-} + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$

Tabla 7. Principales ERO intracelulares junto a las principales reacciones en que se generan.

### 2.2.3. Protección frente a estrés oxidativo - Sistemas antioxidantes

En condiciones fisiológicas, las células del organismo se encuentran protegidas frente al daño derivado del EO generado por ER. Dentro de estos sistemas de defensa se incluyen sistemas enzimáticos y sistemas no enzimáticos, que protegen mediante diversos mecanismos: capacidad de captación/degradación de las ERO intracelulares (con inhibición de los procesos en que éstas se involucran), prevención de la generación de ERO, unión a iones metálicos que catalizan reacciones que involucran a las ERO, y capacidad para potenciar la actividad y activar la expresión de enzimas antioxidantes (Chaudière y Ferrari-Iliou, 1999).

**Sistemas enzimáticos.** Disminuyen y neutralizan los niveles intracelulares de ERO en el organismo, y reparan el daño producido por las mismas, manteniendo una protección frente a las especies pro-oxidantes (Pamplona y Constantini, 2011). Sus acciones se encuentran

interrelacionadas (Figura 10). Por su relevancia en la protección frente al EO, se pueden destacar las siguientes enzimas:

- Superóxido dismutasa (**SOD**): cataliza la dismutación del anión superóxido en  $O_2$  molecular y peróxido de hidrógeno, actuando como primera línea de defensa del organismo frente al daño producido por RL. En células de mamíferos, está presente en dos isoformas principales: SOD-1, que es un homodímero de localización citosólica y dependiente de cobre y zinc, y SOD-2, un homotetrámero presente en la mitocondria y dependiente de manganeso; esta isoforma es inactivada por elevados niveles mitocondriales de  $O_2^{\bullet-}$ , lo que agrava el daño oxidativo mitocondrial y demuestra la importancia de dicha enzima (Fridovich, 1995; McCord, 2002).

- Glutación peroxidasa (**GPx**): existen diversas isoformas de esta enzima (dependientes e independientes de selenio), localizadas a nivel citosólico principalmente, y mitocondrial. La GPx ejerce un papel clave en la eliminación de hidroperóxidos intracelulares como los lipoperóxidos y el  $H_2O_2$ , utilizando para ello como cofactor al glutatión reducido, que en esa reacción se oxida a GSSG (Margis y col., 2008).

- Catalasa (**CAT**): es una enzima que se localiza mayoritariamente en los peroxisomas, y también está presente en menor medida en mitocondria y citosol, donde convierte el  $H_2O_2$  en agua y oxígeno ( $O_2$ ). Consta de un tetrámero con un grupo hemo (dependiente del ión hierro) unido al centro activo de cada subunidad, y cuya actividad es muy eficiente en la eliminación de  $H_2O_2$ , y no saturable (Goyal y Basak, 2010). Las enzimas CAT y GPx son, pues, claves en la detoxificación de peróxidos a nivel de células cerebrales; pero por la mayor actividad de la GPx en células del SNC (hasta siete veces mayor que la de CAT) y su ubicuidad (CAT se restringe en mayor medida a su presencia en peroxisomas), puede considerarse que GPx ejerce una mayor protección en cerebro frente a los niveles de  $H_2O_2$  (Marklund y col., 1982).

- Glutación reductasa (**GR**): no tiene un efecto antioxidante primario, pero sí es una enzima secundaria clave en el metabolismo del glutatión. De localización predominantemente citosólica, esta flavoproteína homodímera utiliza NADPH como cofactor y cataliza la reducción del GSSG a GSH, que contribuye a mantener el estado reducido de la célula y es utilizado como un antioxidante fundamental en la reducción de peróxidos por la GPx (Couto y col., 2016).

- Hemooxigenasa-1 (**HO-1**): es una enzima que cataliza la degradación del grupo hemo hasta generar monóxido de carbono (CO),  $Fe^{2+}$  y biliverdina, que es un pigmento tetrapirrólico de color verde/azul presente, por ejemplo, en la bilis; esta última es transformada en una reacción posterior en bilirrubina por acción de biliverdina reductasa. Su papel citoprotector se basa en el potencial antioxidante de la biliverdina y sobre todo de la bilirrubina generada  $\alpha$

*posteriori*, que son compuestos capaces de captar radicales peroxilo e hidroxilo, entre otros. Además, la HO-1 evita los efectos pro-oxidantes de los grupos hemo (Schipper, 2000; Deshane y col., 2005). Su expresión se induce en respuesta a diversos estímulos de estrés, incluyendo las ERO, luz UV, hipoxia e iones metálicos, y se ha descrito que juega un papel relevante en los procesos de neuroprotección (Kaizaki y col., 2006; Jazwa y Cuadrado, 2010).

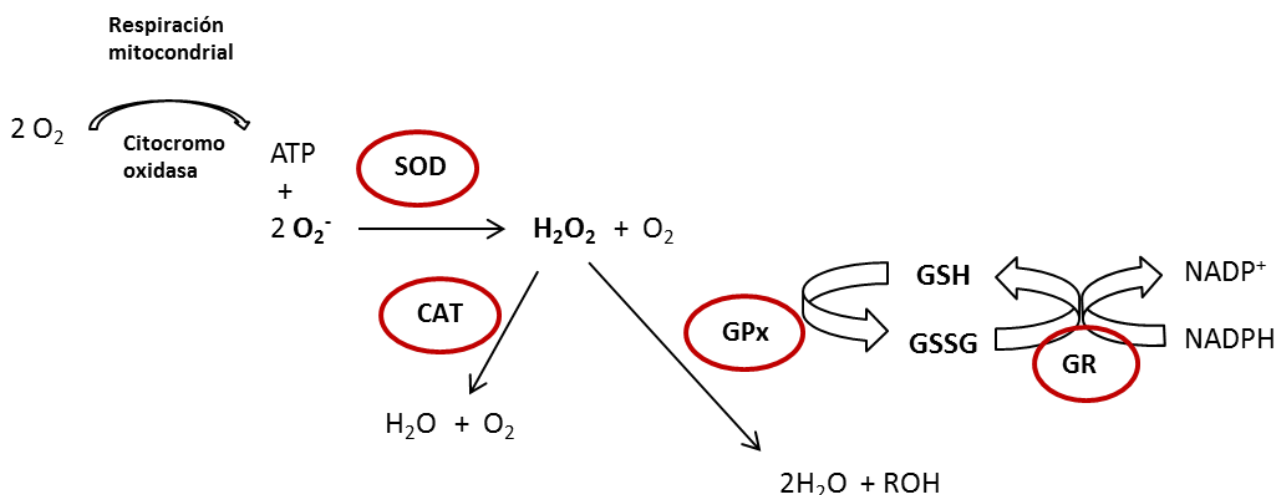


Figura 10. Las actividades de las enzimas antioxidantes se encuentran interconectadas por las ERO intermedias. La correcta función de todas ellas asegura una adecuada protección frente al EO en condiciones fisiológicas.

**Sistemas no enzimáticos.** En general, comprenden moléculas de bajo peso molecular de origen endógeno o exógeno (micronutrientes) que actúan en la primera línea de defensa antioxidante como captadores de ERO ("*scavengers*"), y complementan la acción de los sistemas enzimáticos. Mediante la donación de electrones, reducen y hacen menos reactivas a las ERO, enlentecen las reacciones de oxidación en cadena (como, por ejemplo, la peroxidación lipídica) y previenen del daño oxidativo (Halliwell, 2001). Cabe destacar los siguientes:

- Glutatión (L-γ-glutamyl-L-cisteinilglycine): tripéptido hidrosoluble que constituye el principal sistema antioxidante endógeno no enzimático, presente en todos los tejidos del organismo. En condiciones fisiológicas, prevalece en su forma reducida y activa (GSH), actuando como donador de protones (a partir del grupo tiol de su cisteína) en reacciones de reducción de diversos sustratos y transformándose posteriormente en su forma oxidada (GSSG). La forma oxidada es reducida a GSH de nuevo por la GR en presencia de NADPH, manteniendo así bajos los niveles intracelulares de GSSG (Schafer y Buettner, 2001; Wu y col., 2004). El GSH es la primera barrera de protección frente al EO: es clave en la eliminación de peróxidos orgánicos y  $\text{H}_2\text{O}_2$  por medio de la GPx, e igualmente en la captación de otras ERO y ERN y en la detoxificación de xenobióticos (Dickinson y Forman, 2002). Su síntesis, limitada por

la actividad de la enzima  $\gamma$ -glutamylcisteína, es de localización citosólica y el GSH luego puede transportarse a mitocondria por sistemas antiportadores donde reduce el efecto de las ERO y ayuda a preservar la integridad de la membrana. También puede transportarse por difusión pasiva al núcleo donde juega un papel clave para mantener reducidos los grupos SH de las proteínas que regulan la reparación y la expresión de ADN (Lash, 2006; Lu, 2013). Es el sistema antioxidante más eficiente del cerebro, donde toma gran importancia al actuar como neuromodulador/neurotransmisor por su unión a los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), y porque su deficiencia provoca un significativo daño mitocondrial, que es relevante en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson (Dringen, 2000; Martin y Teismann, 2009).

- Coenzima Q (ubiquinona): molécula lipídica de origen endógeno, presente en la cadena de transporte de electrones mitocondrial. En su forma reducida como ubiquinol es un eficaz antioxidante frente a las ERO, capaz de prevenir la iniciación y/o propagación de la peroxidación lipídica en membranas biológicas y lipoproteínas séricas (Ernster y Forsmark-Andrée, 1993).

- Vitaminas: la vitaminas A (retinol) y, sobre todo, la vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) tienen gran capacidad de captación de ERO a nivel de las membranas plasmáticas, previniendo la oxidación de lípidos y captando hidroperóxidos lipídicos. La vitamina C es hidrosoluble y, a nivel intra y extracelular, es muy efectiva como captador de ERO (p. ej.,  $O_2^{\bullet-}$ ,  $OH^{\bullet}$  y  $H_2O_2$ ) (Sies y col., 1992; McCall y Frei, 1999).

- Carotenos: son pigmentos orgánicos (algunos son precursores de vitaminas) que presentan cadenas de dobles enlaces conjugados activos. Obtenidos de la dieta, participan en la defensa antioxidante de las células del organismo, ya que son efectivos en la captación del oxígeno singlete y de radicales peroxilo, bloqueando así reacciones de peroxidación lipídica. Juegan un papel especialmente importante en la fotoprotección de la piel (Stahl y Sies, 2003).

- Ácido úrico: obtenido también a partir de la dieta (derivado del metabolismo de purinas), ejerce importantes efectos antioxidantes *in vivo*, pues es capaz de quelar metales de transición impidiendo las reacciones de generación de ERO, y de eliminar derivados reactivos del oxígeno (Glantzounis y col., 2005).

#### 2.2.3.1. Productos naturales

Todos los sistemas antioxidantes endógenos disminuyen con la edad, así como en ciertos procesos patológicos (incluyendo las enfermedades neurodegenerativas) y bajo determinados factores ambientales como la contaminación atmosférica (Dorado y col., 2003). En esos casos, las defensas antioxidantes intracelulares pueden potenciarse por un mayor

aporte exógeno de compuestos con efecto antioxidante a nivel celular. En este grupo de compuestos cabe destacar los productos naturales derivados de plantas, muchos de los cuales presentan actividad de captación de ERO, quelación de iones metálicos o incluso de potenciar la actividad y expresión de enzimas antioxidantes (Peng y col., 2014; Sadowska-Bartosz y Bartosz, 2014).

En las últimas décadas, diversos estudios han puesto de manifiesto las capacidades antioxidantes de numerosos compuestos naturales en modelos *in vitro* e *in vivo* de patologías relacionadas con el estrés oxidativo, incluyendo las enfermedades neurodegenerativas. Sobresalen, entre ellos, los compuestos polifenólicos por su diversidad de estructuras y efectos (Brewer, 2011; Guerra-Araiza y col., 2013). Se pueden destacar los siguientes ejemplos como algunos de los antioxidantes naturales que han atraído un mayor número de estudios:

- Resveratrol: es un estilbenoide presente en el vino que presenta un contrastado potencial antioxidante en numerosos modelos de estudio, mediante sus propiedades quelantes de metales y su potente capacidad de captación de ERO. Su efecto citoprotector frente al estrés oxidativo, y por el cual se ha propuesto como un potencial agente terapéutico en diversas patologías (como las neurodegenerativas), se atribuye a su capacidad para activar las sirtuinas (SIRT1) y la expresión de genes citoprotectores; su efecto último es el de conferir un mayor potencial antioxidante enzimático a la célula, protegiéndola frente al daño oxidativo (Sun y col., 2010; Carizzo y col., 2013; Kitada y Koya, 2013; Rege y col., 2014).

- Quercetina: flavonoide presente en numerosos vegetales que exhibe una elevada capacidad de interaccionar y quelar iones metálicos como  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ , reduciendo la generación de ERO mediada por ellos (Mira y col., 2002). Además, se ha demostrado su capacidad de aumentar el contenido celular de GSH y de potenciar la GPx para contrarrestar el EO. En neuronas en cultivo, por ejemplo, la quercetina aumenta la supervivencia celular frente a daño oxidativo (Granado-Serrano y col., 2012; Casas-Grajales y Muriel, 2015; Dajas y col., 2015).

- Epigalocatequina galato: es el principal compuesto polifenólico del té (*Camelia sinensis*). Se ha descrito que mejora la función mitocondrial celular por sus propiedades antioxidantes, entre las que se incluyen su capacidad de captación de ERO, la reducción de la peroxidación lipídica y aumento de niveles de GSH. Potencia, además, la expresión de enzimas antioxidantes como SOD y GPx, e inhibe la COX-2 e iNOS (que generan mediadores pro-inflamatorios que desencadenan EO). Ha demostrado efectos beneficiosos en modelos *in vitro*

e *in vivo* de enfermedad de Parkinson y de Alzheimer (Dragicevic y col., 2011; Lee y col., 2013; Renaud y col., 2015).

- Proantocianinas: son un grupo de compuestos polifenólicos obtenidos de numerosas fuentes vegetales, como la semilla de la uva. Presentan una elevada actividad de captación de ERO (p. ej., los radicales superóxido e hidroxilo), ejercen una acción quelante de metales de transición e inhiben la polifenol oxidasa; también previenen la oxidación de moléculas lipídicas, como las presentes en las LDLs. Se ha demostrado su efecto citoprotector *in vivo* e *in vitro* frente a estrés oxidativo inducido por tóxicos exógenos, previniendo del daño oxidativo del ADN y la apoptosis (Bagchi y col., 2014; González-Burgos y col., 2015a).

#### 2.2.4. Implicaciones del daño oxidativo a nivel celular

Las bajas concentraciones fisiológicas de ERO pueden estimular la proliferación y supervivencia en muchos tipos celulares. Pero si los niveles de especies pro-oxidantes son excesivos y la acción de los sistemas antioxidantes es insuficiente, se acumula el daño oxidativo a nivel de las distintas biomoléculas, hasta causar la muerte celular (Martin y Grotewiel, 2006). El **daño oxidativo** depende del nivel de EO y afecta a todos los tipos de biomoléculas, detallándose las más relevantes a continuación.

**Lípidos.** Los fosfolípidos son los principales constituyentes de las membranas biológicas, y son muy susceptibles al ataque mediado por ciertas ERO (p. ej.,  $\text{OH}^\bullet$  y  $^1\text{O}_2$ ); éstas son capaces de extraer un átomo de hidrógeno de los ácidos grasos saturados, iniciando las reacciones en cadena que se conocen como peroxidación lipídica. El radical lipídico que se genera entonces puede reaccionar con  $\text{O}_2$  para dar lugar a un radical peroxilo ( $\text{ROO}^\bullet$ ) (Niki, 2008). A mayor grado de saturación de los ácidos grasos, más susceptibles son de sufrir el ataque oxidativo por ERO, que además puede verse catalizado por la presencia de iones metálicos o radiación UV. El resultado es la alteración de la biodinámica y permeabilidad de las membranas y de los gradientes iónicos, y la generación final de aldehídos reactivos como el MDA o el 4-HNE, que tienen propiedades mutagénicas (O'Brien y col., 2005).

**Ácidos nucleicos.** El daño a estas biomoléculas es el más importante a nivel celular porque involucra efectos sobre las otras biomoléculas, siendo también el más difícil de reparar por los mecanismos antioxidantes. El radical  $\text{OH}^\bullet$  es la ERO que presenta mayor reactividad frente a las bases nitrogenadas del ADN (púricas y pirimídicas) y a la desoxirribosa. Por ataque oxidativo, puede producir la oxidación de dichas bases y la ruptura de las cadenas de ADN, de

forma que se generan diversas mutaciones implicadas en numerosas enfermedades, como enfermedades neurodegenerativas y cáncer (Loft y Poulsen, 1996; Gackowski y col., 2007).

**Proteínas.** Son susceptibles de ser atacadas por ERO, en mayor medida por el radical  $\text{OH}^\bullet$ , y como consecuencia de la presencia en sus estructuras de aminoácidos aromáticos o azufrados. La modificación oxidativa de las proteínas puede provocar su desnaturalización y pérdida de función biológica, que afectará a todas las funciones celulares en que participan, que van desde las actividades enzimáticas o rutas de señalización celular hasta la estructura de membranas y citoesqueleto (Chakravarti y Chakravarti, 2007). Se han descrito alteraciones oxidativas de proteínas en diversas enfermedades relacionadas con el envejecimiento celular, como es el caso de la enfermedad de Alzheimer (Sultana y Butterfield, 2013).

La **mitocondria** es la principal fuente productora de ERO a nivel celular, y a la vez, presenta ciertas características que la convierten en una diana especialmente susceptible al daño oxidativo (Sastre y col., 2003). Cabe destacar la mayor sensibilidad al daño oxidativo del ADN mitocondrial (ADNm) en comparación con el ADN nuclear, por carecer de histonas protectoras y tener mecanismos de reparación poco efectivos. El ADNm codifica para diversas proteínas que ejercen su función en los complejos proteicos de la cadena de transporte electrónico para la generación de ATP. Así, el daño del ADNm y la consecuente alteración de la transcripción y síntesis de esas proteínas altera aún más la funcionalidad de la mitocondria, con pérdida del potencial de membrana (PMM), alteración de niveles de ATP y de la homeostasis del calcio (Shokolenko y col., 2009; Musatov y Robinson, 2012). El EO a nivel mitocondrial, y en particular la acción del anión superóxido, es también responsable de la inactivación de proteínas tan relevantes como la aconitasa, provocando la detención del ciclo de Krebs en que participa y la disrupción de la homeostasis energética (Yan y col., 1997). Respecto al daño a lípidos, hay que subrayar los efectos de las ERO sobre la cardiolipina, que es un fosfolípido insaturado presente en la membrana mitocondrial interna que sirve como soporte estructural y funcional a los complejos proteicos de la cadena de transporte electrónico, incluyendo el citocromo C y la ATP sintetasa (Paradies y col., 2010). La peroxidación de la cardiolipina por ERO provoca que se altere la función mitocondrial, con pérdida de PMM y alteración de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , y que se desencadene la muerte celular por apoptosis, consecuencia de la liberación del citocromo C al citosol y la subsecuente activación de la caspasa 9 (Pope y col., 2008; Schug y Gottlieb, 2009).

Así, los cambios estructurales y funcionales en la mitocondria debidos al EO provocan una disfunción mitocondrial que, a su vez, ocasiona una mayor generación de ERO que

desemboca en la muerte celular. El principal mecanismo de muerte celular debida a situaciones de EO es la apoptosis (muerte celular programada); de entre sus vías de activación, es mayoritaria la vía intrínseca mediada por la mitocondria, que involucra principalmente a la caspasa 9 como iniciadora y a las caspasas 3 y 7 como efectoras (Ryter y col., 2007). En la Figura 11, se resumen los cambios bioquímicos secuenciales que tienen lugar en la célula con la exposición a niveles crecientes de EO.

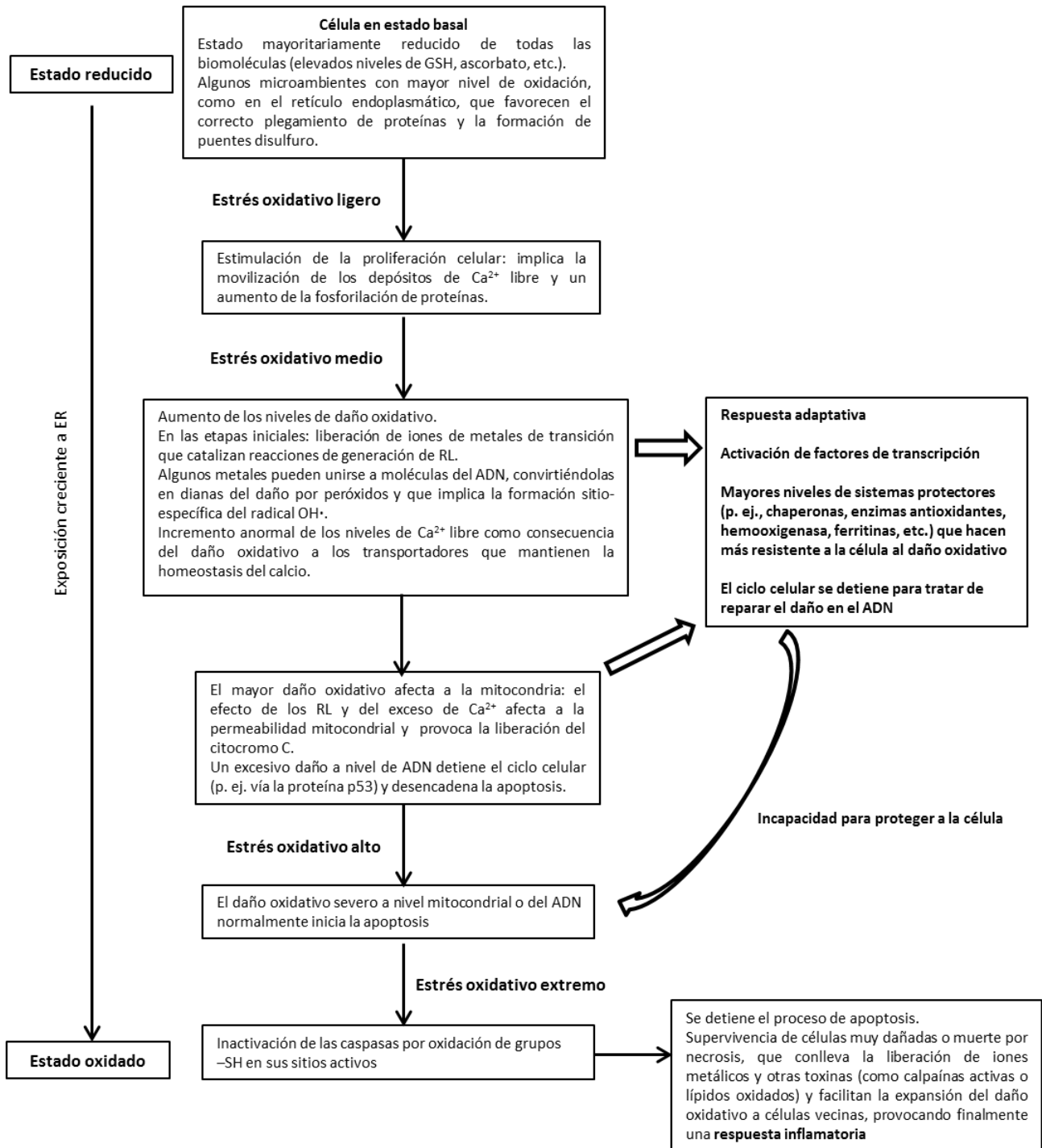


Figura 11. Bioquímica del estrés oxidativo. Adaptada de Halliwell, 2007.



### 2.2.5. Vías de señalización celular implicadas en estrés oxidativo

Como se ha comentado anteriormente, las ERO pueden ejercer efectos directos sobre las biomoléculas, pero muchos de sus efectos nocivos son mediados por cambios en las vías de transducción de señales. Hay diversas vías de señalización intracelular que se ven implicadas en los efectos y respuestas frente al EO, y están en muchos casos están interrelacionadas (Martindale y Holbrook, 2002; Schieber y Chandel, 2014). Entre las vías de protección frente al EO más importantes, pueden destacarse las siguientes:

- **Vía de la proteína kinasa c-Jun N-terminal activada por mitógeno (JNK):** por acción de diversos estímulos extracelulares, incluyendo mediadores del daño oxidativo, la activación de la proteína JNK por fosforilación en dos residuos de tirosina y treonina desencadena la activación transcripcional de genes controlados por AP-1 (proteína activadora-1). La fosforilación de JNK está controlada por distintas proteínas kinasas activadas por mitógeno (MAPKs) y, en última instancia, regula procesos de reparación de ADN, apoptosis y proliferación/diferenciación celular. Esta vía también se activa por un exceso en la generación mitocondrial de ERO (Schattenberg y Czaja, 2014; Shaukat y col., 2016).
- **Vía de la PI3K/AKT:** la activación de AKT (proteína kinasa B) por estrés oxidativo requiere de su migración del citoplasma a la membrana donde se fosforila por mediación de la fosfatidil inositol 3 kinasa (PI3K) (en residuos de tirosina y tronina). Una vez activa en citoplasma, o tras su traslocación al núcleo, regula (mediante su capacidad de fosforilar proteínas) procesos como la supervivencia celular por inactivación de diversos factores proapoptóticos (p. ej., Bad, procaspasa-9 y GSK-3) o por expresión de genes que favorecen la supervivencia frente al daño oxidativo (Maiese y col., 2012; Zhang y col., 2016).
- **Vía del NF-κB:** principal vía de señalización celular por la cual se interrelacionan el EO y la respuesta inflamatoria celular. La activación de NF-κB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) implica la fosforilación y degradación de la proteína inhibitoria IκB, y la consecuente liberación de las subunidades activas p50 y p52, que son capaces de entrar en el núcleo y regular la transcripción génica. Esta vía se activa por señales como el factor de necrosis tumoral o la IL-1, pero también por ERO como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Su activación (en muchos casos a través del receptor de estrógenos) supone la activación de la expresión de genes de SOD-2 y GPx, y otros genes antiapoptóticos, favoreciendo la protección frente a EO (Bowie y O'Neill, 2000; Vina y col., 2011; Donato y col., 2015).

Pero la vía de señalización más importante en la respuesta de las células al EO, y en especial en células del SNC, es la **vía del factor de transcripción Nrf2**.

#### 2.2.5.1. Vía del Nrf2

El factor Nrf2 (*“nuclear factor erythroid 2-related factor 2”* o factor nuclear eritroide-2) fue descubierto por primera vez en 1994 (Moi y col., 1994) en los intentos por elucidar los mecanismos de activación del elemento de respuesta antioxidante (ARE), que se había identificado previamente como el promotor de la transcripción de los genes codificantes para proteínas antioxidantes y enzimas detoxificantes de fase 2 (Okuda y col., 1989). Desde entonces, ha habido un creciente interés por este factor de transcripción y el mecanismo de señalización intracelular en que participa, que se ha demostrado clave en las respuestas de neuroprotección, anti-carcinogénesis y anti-inflamación (Bryan y col., 2013). Se trata de un factor de transcripción que pertenece a la familia de proteínas denominada *“cap ‘n’ collar”*: entre sus dominios estructurales destaca en su extremo C-terminal una cremallera de leucinas (motivo estructural supersecundario de proteínas que genera fuerzas de adhesión a través de hélices alfa en paralelo) responsable de la unión al ADN, y al ARE concretamente, y una región ácida imprescindible para la activación transcripcional (Figura 12) (Motohashi y Yamamoto, 2004).

El sistema Nrf2-ARE es uno de los mecanismos clave en la respuesta frente al estrés oxidativo y en el proceso de supervivencia y proliferación celular; este sistema no es único de mamíferos sino que está presente en otros organismos, entre los que se incluyen algunos insectos y nematodos (Sykietis y Bohmann, 2008; Pickering y col., 2013). En condiciones de homeostasis redox, el factor Nrf2 se localiza en el citoplasma donde está unido a dos proteínas denominadas *“Kelch-like ECH association protein 1”* (Keap-1), mediante los dominios ETGE y DLG (llamados así por las secuencias aminoacídicas que los constituyen). Keap-1 favorece que el factor Nrf2 sea rápidamente degradado por el sistema de ubiquitina-proteasoma, de manera que su vida media en el citosol es muy corta (Tong y col., 2007). En situaciones de EO con excesivos niveles de ERO o por la acción de compuestos electrofílicos sobre el complejo Nrf2-Keap1, Nrf2 se estabiliza por modificación de grupos tiol o fosforilación de residuos por diversas kinasas y se disocia de Keap-1 (Kobayashi y col., 2006). Posteriormente, Nrf2 se transloca al núcleo en un proceso controlado por la fosfatidil-inositol-3 kinasa (PI3K), que involucra reordenamientos en los filamentos de actina. Una vez en el núcleo, su dimerización con proteínas de la familia Maf es el paso previo a su unión a la región del ADN específica

(ARE), lo que favorecerá la transcripción de los genes diana de ARE (Kang y col., 2005) (ver Figura 12).

Entre los genes cuya transcripción se ve favorecida por la activación del sistema Nrf2-ARE se encuentran las enzimas citoprotectoras antioxidantes y las enzimas detoxificantes de fase II (p. ej., SOD, GPx, CAT, HO-1, etc.). Se ha demostrado también su relevancia en los niveles de enzimas que participan en la síntesis de glutatión, existiendo una relación directa entre el grado de activación del sistema Nrf2 y las concentraciones de GSH (Suh y col., 2004). Se entiende, pues, que alteraciones en la normal función de esta vía de señalización desencadenarán deficiencias en los procesos de defensa frente al estrés oxidativo y otros xenobióticos y, en consecuencia, procesos degradativos a nivel celular.

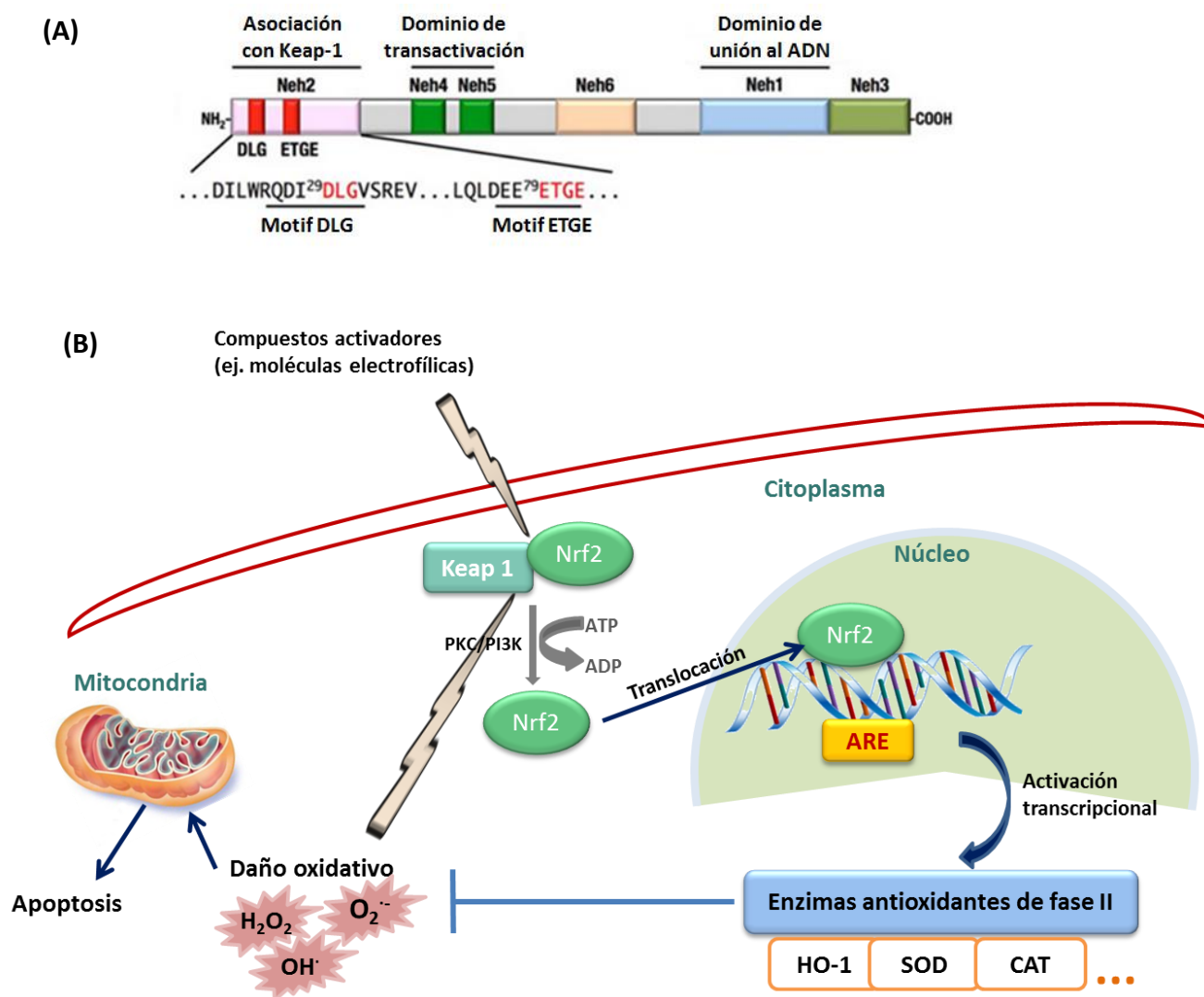


Figura 12. Estructura del factor Nrf2 con sus distintos dominios (A) y esquema representativo de la activación del sistema de señalización celular Keap-1/Nrf2/ARE (B).

## 2.3. El estrés oxidativo en enfermedades neurodegenerativas

En las últimas décadas, se ha descrito la implicación del estrés oxidativo en numerosas patologías humanas, entre las que se encuentran la diabetes (Baynes, 1991), las enfermedades cardiovasculares (Santilli y col., 2015) y el cáncer (Valko y col., 2006). Actualmente, existe un consenso científico basado en sólidas investigaciones sobre la implicación del estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad (Moreira y col., 2005; Li y col., 2013), a pesar de que puede discutirse si actúa como un factor sólo causal, o es también una consecuencia propia de dichas patologías (Andersen, 2004; Díaz-Hung y González-Fraguela, 2014).

El desequilibrio redox propio del EO afecta al SNC en mayor medida que a otros órganos, donde genera daño irreversible (a través de los eventos celulares previamente mencionados) que desemboca en la neurodegeneración. Nos centraremos en el estudio de las enfermedades neurodegenerativas, aunque el daño oxidativo a nivel cerebral ocurre igualmente en la situación fisiológica del envejecimiento (Floyd y Hensley, 2002). La **mayor susceptibilidad de las células del cerebro** al EO se explica por los siguientes motivos (Halliwell, 2001):

- Escasos niveles de defensas antioxidantes, sobre todo de defensas enzimáticas. El cerebro tiene niveles particularmente bajos de la enzima catalasa, con respecto a otros tejidos (Hipólito y col., 2007).
- Elevado contenido en ácidos grasos poliinsaturados, principalmente el ácido araquidónico y el docosahexaenoico. Éstos contienen mayor cantidad de dobles enlaces que los hace más sensibles a la sustracción de un átomo de hidrógeno por parte de los RL, formándose los radicales peroxilo que inician la peroxidación lipídica (Bazinet y Layé, 2014).
- Elevado nivel metabólico del cerebro, que consume una gran cantidad de oxígeno (hasta el 20% del oxígeno basal) en comparación con el peso del tejido, ya que se requiere gran cantidad de energía para el mantenimiento de la fisiología neuronal normal (p. ej., mantenimiento de los potenciales de membrana, síntesis y secreción de neurotransmisores, etc.) (Erecińska y Silver, 2001).
- Presencia de zonas cerebrales con alto contenido en iones hierro y cobre, como los ganglios basales. Estos iones pueden catalizar reacciones de peroxidación lipídica y generación de ERO (Moos, 2002).
- Presencia de neurotransmisores pro-oxidantes, tales como la dopamina (en cuyo metabolismo por las enzimas MAO se genera  $H_2O_2$  como producto), y excitotóxicos como el

glutamato (que en concentraciones anormales conduce a la ruptura de la homeostasis intracelular del calcio, entre otros efectos citotóxicos) (Keating, 2008).

- Alto contenido en moléculas autooxidables (p. ej., serotonina y norepinefrina) y del citocromo P450, que pueden favorecer la generación de ERO (Jenner, 1998).

El EO afecta a todas las células del SNC (incluyendo las de la BHE), si bien se acepta que las neuronas son más vulnerables que el resto de células al EO debido a las ERO. Dicha vulnerabilidad es consecuencia de sus menores niveles de defensas antioxidantes y elevado consumo de O<sub>2</sub> respecto a las células de la glía (Wang y Michaelis, 2010). Ésto, unido a la reducida capacidad de regeneración celular, hacen de las neuronas una diana especialmente sensible a la degeneración por daño oxidativo (Gao y col., 2016).

La viabilidad celular de los astrocitos también se ve comprometida por el daño oxidativo debido a ERO, pero en general, son células más resistentes a la citotoxicidad que las neuronas. Presentan concentraciones más elevadas de GSH, incluso aportan precursores para su síntesis a las neuronas, y poseen mayor capacidad de contrarrestar elevados niveles de ERO ejerciendo de este modo cierto papel neuroprotector (Takuma y col., 2004). Algunos estudios *in vitro* han puesto de manifiesto la menor capacidad de contrarrestar los procesos oxidativos de las neuronas y el mayor contenido en enzimas antioxidantes de los astrocitos, que les confiere la mayor resistencia y la capacidad de proteger a las neuronas en co-cultivos (Chen y col., 2001; Rao y col., 2010).

El daño oxidativo a nivel de células del SNC está siempre presente, en mayor o menor medida, en todas las **enfermedades neurodegenerativas**. Estas enfermedades, a pesar de tener etiologías diferentes (p. ej., mutaciones genéticas, factores ambientales, estilo de vida, dieta, etc.), están en su mayoría relacionadas con el envejecimiento, que se asocia a la acumulación progresiva de daños en las biomoléculas debido al metabolismo oxidativo (Niedzielska y col., 2016). Las alteraciones a nivel de biomoléculas provocan mutaciones genéticas, disfunción mitocondrial y ensamblaje inadecuado de proteínas, entre otros eventos intracelulares, que conducen finalmente a la atrofia y muerte progresiva de las células del SNC (Hung y col., 2010).

Por todo lo expuesto anteriormente, la llamada “hipótesis del estrés oxidativo” ha cobrado fuerza en las últimas décadas como uno de los factores causales/consecuenciales de la patogenia de las enfermedades neurodegenerativas entre las que se incluyen la enfermedad

de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica y la enfermedad de Huntington (Kim y col., 2011).

### 2.3.1. Estrés oxidativo en enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es la principal causa de demencia en personas mayores de 60 años. Se relaciona, pues, con un deterioro clínico de la función cognitiva, progresivo e irreversible, y muerte neuronal excesiva. Es la enfermedad neurodegenerativa más prevalente (afectaba a más de 35 millones de personas en 2010) y se prevé que su incidencia siga aumentando, debido al envejecimiento progresivo de la población hasta cuadruplicar el número de casos en el año 2050, si no aparecen estrategias efectivas para su tratamiento (Alzheimer's Association, 2015; Hickman y col., 2016).

Numerosas evidencias apuntan a la implicación del EO en el desarrollo temprano de la enfermedad. Los dos principales eventos patológicos que acontecen en el SNC de los pacientes de Alzheimer son la presencia de placas amiloides y los ovillos neurofibrilares; en ambos, el EO juega un papel esencial (Reddy y col., 2009; Axelsen y col., 2011; Chen y Zhong, 2014). En esta enfermedad, resulta característico el elevado contenido cerebral de iones cobre y hierro, que estimulan la generación de ERO y promueven la oxidación de proteínas y moléculas de ADN. Cuando el péptido  $\beta$ -amiloide se libera a la sinapsis glutamatérgica, reacciona con los iones metálicos de modo que forma agregados oxidados que precipitarán generando las placas amiloides (Ballard y col., 2011). Además, se han descrito mecanismos que implican la formación de RL y ERO, sobre todo  $H_2O_2$  en presencia de iones metálicos, en la neurotoxicidad que ejercen los péptidos A $\beta$  en modelos neuronales *in vitro* (Li y col., 2016).

Estudios *post-mortem* y análisis de sangre de pacientes de esta enfermedad han revelado la presencia de niveles muy elevados de ciertos marcadores de EO. Se han observado altas concentraciones de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina y 8-hidroxiguanosina como marcadores de oxidación de ácidos nucleicos; también se han determinado altos niveles de marcadores de lipoperoxidación (MDA, 4-HNE y acroleína) y de proteínas carboniladas/nitrosiladas por oxidación (Swomley y Butterfield, 2015). Se ha demostrado la existencia de disfunción mitocondrial en las neuronas debido a una parcial inhibición de la actividad del complejo IV mitocondrial (Friedland-Leuner y col., 2014). Además, los astrocitos presentan alteraciones funcionales en los cerebros de pacientes de Alzheimer, disminuyendo su función neuroprotectora (Steele y Robinson, 2012).

### 2.3.2. Estrés oxidativo en enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson es el segundo trastorno neurodegenerativo crónico más prevalente en el mundo, y el más común de los que afectan al sistema locomotor. Con mayor prevalencia en personas mayores de 60 años, se estima que a nivel mundial más de 4,5 millones de personas sufren de esta enfermedad; además, se cree que esta cifra se doblará en menos de tres décadas (Muangpaisan y col., 2011; Willis, 2013).

Respecto a su fisiopatología, en el cerebro de pacientes con Parkinson destaca la presencia de muerte celular progresiva de poblaciones neuronales concretas, en especial las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra, donde se detectan niveles mucho más elevados de ERO que en sujetos sanos (Olanow y Tatton, 1999). En las neuronas que sobreviven, aparecen inclusiones proteicas citoplasmáticas (*cuerpos de Lewy*) constituidas en su mayoría por filamentos proteicos de  $\alpha$ -sinucleína (Kalia y col., 2013), y también se han descrito parámetros alterados de la homeostasis óxido-reducción: menor contenido en GSH y mayor concentración de marcadores de peroxidación lipídica (p. ej., 4-HNE) y de oxidación de proteínas y ADN (p. ej., 8-oxo-deoxiguanina) (Schultz y col., 2000; Sanders y Greenamyre, 2013).

La disfunción mitocondrial juega un papel clave en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson. Se ha descrito la inhibición del complejo I de la cadena de transporte electrónico mitocondrial en las neuronas de la sustancia negra y la consecuente pérdida del potencial de membrana (Schapira y col., 1990). Las mitocondrias, expuestas a un microambiente oxidante, presentan una disfunción que supone la generación de más ERO (p. ej.,  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $^\bullet\text{NO}_2$ ) y menor cantidad de ATP, lo que aumenta la vulnerabilidad al daño oxidativo de las neuronas. Además, la depleción de dopamina de las neuronas provoca un aumento en su metabolismo por las enzimas MAO, que favorece la generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  principalmente (Jenner, 2003). Por último, se ha demostrado recientemente la presencia de altos niveles de hierro en las neuronas de la sustancia negra, que implica la alteración de ciertos transportadores de hierro y favorecerá, vía reacciones de Fenton, un mayor daño oxidativo (Wang y col., 2007).

### 2.3.3. Estrés oxidativo en otras enfermedades neurodegenerativas

La enfermedad (o Corea) de Huntington es un trastorno hereditario consecuencia de mutaciones en el gen de la proteína huntingtina, que da lugar a defectos metabólicos que desembocan en la degeneración de las neuronas gabaérgicas de los ganglios basales. Como

signos clínicos típicos presenta movimientos coreiformes involuntarios y alteraciones psiquiátricas (Walker, 2007). Numerosas evidencias han demostrado que la acumulación intracelular de la huntingtina anómala desencadena por sí misma la producción de ERO, en lo que también influyen los altos niveles de hierro y cobre presentes en el SNC de estos pacientes (Firdaus y col., 2006; Reijonen y col., 2010). La huntingtina genera disfunción mitocondrial interaccionando directamente con el orgánulo, alterando la respiración (inhibe la actividad del complejo II), el potencial de membrana mitocondrial y la captación del  $\text{Ca}^{2+}$  (Bossy-Wetzel y col., 2008). Modelos *in vivo* y estudios *post-mortem* evidencian la existencia de niveles elevados de productos de daño oxidativo en el SNC, incluyendo proteínas nitradas y peróxidos lipídicos (p. ej., acumulación de lipofuscina), entre otros. (Browne y col., 1999; Stack y col., 2008); todo ello demuestra la implicación del EO en la enfermedad de Huntington.

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa en la que se ven afectadas de manera irreversible las neuronas motoras, incluyendo daño a nivel del asta anterior de la médula y vía corticoespinal (Katz y col., 2015). Su etiología no está muy clara, pero se sabe que en torno al 10 % de los casos son genéticos y se deben a mutaciones en la SOD-1 dependiente de cobre y zinc (Rosen y col., 1993). En esos casos, se produce una alteración de la respiración mitocondrial, del almacenamiento de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y una producción aberrante de ERO, que provocará daño oxidativo a proteínas y lípidos mitocondriales, liberación de citocromo C (pro-apoptótico) y mayor deterioro neuronal (Vijayvergiya y col., 2005; Lin y Beal, 2006).

La ataxia de Friedreich es otra de las denominadas “enfermedades mitocondriales” que se caracteriza por la deficiencia de la proteína mitocondrial frataxina. Dicha deficiencia se asocia a anomalías en el metabolismo del hierro que llevan a su acumulación en la mitocondria, generando disfunción del metabolismo energético (Federico y col., 2012). Del mismo modo, esto conlleva la formación de anión superóxido y favorece una situación de estrés oxidativo, que se ha demostrado que contribuye a la neurodegeneración en esta enfermedad (Gomes y Santos, 2013; González-Cabo y Palau, 2013).



## 2.4. Estrategias de neuroprotección

El mantenimiento de la homeostasis óxido-reducción resulta capital para la fisiología de los tejidos (Calabrese y col., 2007). Las evidencias de la implicación del EO en la etiología de las enfermedades neurodegenerativas han animado a la búsqueda de estrategias terapéuticas que contrarresten el daño celular oxidativo. El objetivo final debe ser el de retrasar o impedir la degeneración neuronal y el mantenimiento de las funciones celulares normales. Con este fin, se han implementado diversos modelos *in vitro* e *in vivo* que buscan reproducir los eventos patológicos de cada una de las enfermedades neurodegenerativas y sobre los cuales se investigan distintas estrategias de citoprotección frente a agentes nocivos externos (Price y col., 1998; Gubellini y Kachidian, 2015; Niedzielska y col., 2016). Cabe destacar, por ejemplo, los modelos animales basados en pesticidas (p. ej., MPTP y rotenona, entre otros) para el estudio de potenciales fármacos en la terapia del Parkinson o los modelos mutantes en roedores (p. ej., Tg2576 y 3x-Tg, entre otros) para el estudio de la enfermedad de Alzheimer. En ciencia básica, se utilizan frecuentemente cultivos celulares primarios de células de SNC (neuronas y glía) y líneas celulares inmortalizadas derivadas de las mismas. Entre estas últimas destaca el extenso uso de la línea celular SH-SY5Y como modelo de neuronas dopaminérgicas (Xie y col., 2010) y de la línea celular U373-MG como modelo de células de astroglia (Martín y col., 2011; González-Burgos y col., 2013b).

Se han desarrollado terapias específicas para muchas de las enfermedades neurodegenerativas teniendo en cuenta las peculiaridades de la patología de las mismas. En este sentido, se utilizan la L-DOPA, los agonistas dopaminérgicos (p. ej., bromocriptina y pramipexol) y los inhibidores de la MAO-B (p. ej., selegilina) en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, y los inhibidores de la acetilcolinesterasa (p. ej., rivastigmina y galantamina) y los antagonistas de glutamato (p. ej., memantina) en la de Alzheimer, entre otros (Solanki y col., 2016). Sin embargo, los tratamientos disponibles sólo se dirigen a mejorar los síntomas derivados de la muerte neuronal una vez que se ha diagnosticado la enfermedad (cuando ya hay un importante deterioro del SNC), sin prevenir su inicio ni curar la patología (Flórez y col, 2013). Por ello, existe también un enfoque global de búsqueda de potenciales fármacos que contrarresten anomalías neuronales que son comunes a todos los trastornos neurodegenerativos, como el daño oxidativo a nivel del SNC.

### 2.4.1. Antioxidantes: relevancia de los compuestos naturales

Hasta la fecha, la estrategia más común para combatir los elevados niveles de ERO en células de SNC ha sido el estudio de compuestos antioxidantes, cuyo aporte exógeno permita combatir el EO por los diversos mecanismos antioxidantes: captación directa de ERO, quelación de iones metálicos, potenciación de la actividad de enzimas antioxidantes e inhibición de enzimas pro-oxidantes (p. ej., NOS y mieloperoxidasa), entre otros (Soobrattee y col., 2005; Uttara y col., 2009; Fujita y col., 2012).

En las últimas décadas, ha cobrado especial relevancia la investigación de los productos naturales como antioxidantes, motivado en parte por cuestiones de seguridad y toxicidad de los antioxidantes sintéticos (p. ej., BHA, BHT, etc.) utilizados por la industria alimentaria (Brewer, 2011). Dentro del grupo de compuestos naturales, destacan sobremanera los polifenoles derivados del metabolismo secundario de plantas. Su bioactividad como antioxidantes se atribuye, principalmente, a la capacidad de donar átomos de hidrógeno de los grupos hidroxilo fenólicos, formando radicales muy estables y poco reactivos por deslocalización de la carga en los anillos aromáticos (Guerra-Araiza y col, 2013). Diversos estudios epidemiológicos y meta-análisis aportan una evidencia consistente que sugiere que un consumo prolongado de polifenoles de plantas aporta protección frente a diversas enfermedades asociadas a daño oxidativo celular, incluyendo las enfermedades neurodegenerativas (Scalbert y col., 2005; Pandey y Rizvi, 2009).

Numerosos estudios en modelos *in vitro* (cultivos celulares) e *in vivo* (modelos animales) de enfermedades neurodegenerativas han revelado resultados prometedores para algunos grupos de compuestos naturales fenólicos. Las propiedades neuroprotectoras pre-clínicas de algunos de ellos en modelos de enfermedades de Parkinson y Alzheimer, entre otros, están ampliamente caracterizadas (Albarracin y col., 2012; Ebrahimi y Schluesener, 2012; Lakey-Beitia y col., 2015; Brady y col., 2016; Niedzielska y col., 2016). Tal y como se describe en el apartado 2.2.3.1. de la presente sección, entre los antioxidantes naturales más activos cabe destacar los flavonoides del vino (Martín y col., 2011), la quercetina (Beckmann y col., 2014), las catequinas del té (Mandel y col., 2011; Solanki y col., 2015), las proantocianidinas (González-Burgos y col., 2015a) o el estilbenoide resveratrol (Bastianetto y col., 2015), entre otros.

Además de los compuestos fenólicos más comunes, también se ha descrito el potencial neuroprotector, basado en propiedades antioxidantes, de otros grupos de compuestos con estructuras diferentes. Algunos ejemplos son los siguientes:

- Ginsenosídeos: son metabolitos secundarios aislados de plantas del género *Panax* (*Araliaceae*), muy utilizadas en medicina tradicional, que tienen estructuras diversas, siendo la mayoría de ellos compuestos con naturaleza de saponinas triterpénicas. Se han demostrado activos en la modulación del estado redox de la célula; son capaces de evitar la excesiva producción de ERO mediante efectos estabilizadores sobre la mitocondria, la prevención de la excitotoxicidad por glutamato y el mantenimiento de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ . Destacan sus actividades en modelos animales de la enfermedad de Parkinson y, de entre todos ellos, las actividades neuroprotectoras del ginsenosido Rb1 (Rausch y col., 2006; González-Burgos y col. 2015b; Ahmed y col., 2016).

- Ginkgolídeos: lactonas terpénicas que se han identificado como compuestos neuroprotectores a partir del uso tradicional en medicina del extracto de la planta *Ginkgo biloba* (Egb761), del que son componentes junto a diversos flavonoides. Se ha demostrado su potencial antioxidante como captadores de radicales libres y como agentes antioapoptóticos. El ginkgolídeo B es el compuesto más activo de este grupo, y es capaz, por ejemplo, de inhibir el estrés oxidativo generado por bupivacaína en neuronas en cultivo, reduciendo la formación de ERO, atenuando la disfunción mitocondrial y disminuyendo la apoptosis neuronal (Xia y Fang, 2007; Li y col., 2013; Mohanta y col., 2014; Nabavi y col., 2015).

- Terpenos: es un grupo muy diverso de estructuras con numerosas actividades farmacológicas entre las que destacan las antioxidantes, que les permiten ejercer efectos citoprotectores frente a EO. Por ejemplo, nuestro grupo de investigación ha demostrado en los últimos años propiedades neuroprotectoras en modelos celulares de neurona y astrocito de diterpenos aislados del género *Sideritis* (p. ej., andalusol y lagascatriol), y de monoterpenos aislados del aceite esencial de *Salvia lavandulifolia*, tales como el  $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol diterpenos y monoterpenos (González-Burgos y col., 2013c; Porres-Martínez y col., 2015).

- Poliquétidos: son compuestos sintetizados mayoritariamente por hongos, entre los que se incluyen los macrólidos. Aunque sus propiedades antioxidantes y neuroprotectoras están menos estudiadas, sí hay algunos estudios que presentan resultados interesantes. Por ejemplo, la bikaverina es capaz de revertir el daño oxidativo causado por  $\text{H}_2\text{O}_2$  en células neuronales *in vitro* y favorece la supervivencia neuronal a través de efectos antioxidantes como la potenciación de la expresión de CAT y SOD. También, la eritromicina ejerce efectos neuroprotectores *in vitro* mediados por acciones antioxidantes, como la reducción de

marcadores de peroxidación lipídica y de oxidación de ADN (Nirmaladevi y col., 2014; Nabavi y col., 2015). En este grupo se encuadran los metabolitos secundarios de líquenes, sobre los que se está desarrollando el conocimiento de sus propiedades antioxidantes; en los últimos años están surgiendo las primeras publicaciones en relación a su potencial neuroprotector (Luo y col., 2016; Fernández-Moriano y col., 2015a, 2016; Reddy y col., 2016).

A pesar de lo expuesto anteriormente, y en contra de lo que se pudiera esperar, hasta ahora muy pocos antioxidantes de origen natural (incluyendo los polifenoles) se han mostrado efectivos como fármacos neuroprotectores en fases clínicas (Danta y Piplani, 2014; Kim y col., 2015). Su baja eficacia clínica puede deberse a la baja biodisponibilidad, su rápido metabolismo, y a una pobre absorción a través de la BHE, que les impiden alcanzar concentraciones eficaces en el SNC (Pandareesh y col., 2015; Brglez-Mojzer y col., 2016).

En la Tabla 8 se recogen los efectos antioxidantes más significativos obtenidos para compuestos naturales en ensayos clínicos de enfermedades neurodegenerativas, así como otros ejemplos de compuestos naturales que se han probado en fases clínicas para estas enfermedades. Cabe destacar la vitamina E, cuya mayor ingesta ha demostrado ser eficaz frente a las enfermedades de Alzheimer y Parkinson (Morris y col., 2002; Zhang y col., 2002).

Compuesto	Enfermedad	Tiempo hasta evaluación y dosis	Resultados y efectos antioxidantes observados	Referencia
Vitamina C y vitamina E	Enfermedad de Alzheimer	12 meses. Vitamina C 1.000 mg/día + vitamina E 400 UI/día	↓Oxidación en el fluido cerebroespinal	Arlt y col., 2012
Vitamina C, vitamina E y ácido $\alpha$ -lipoico	Enfermedad de Alzheimer	16 semanas. Vitamina C 500 mg/día, vitamina E 800 UI/día y ácido lipoico 900 mg/día	↓ Isoprostano F2 (marcador de peroxidación de ácido araquidónico) en el fluido cerebroespinal	Galasko y col., 2012
Vitamina E (junto a riluzol)	ELA	3 meses. 500 mg dos veces al día	↑GPx en plasma, ↓TBARS en plasma	Desnuelle y col., 2001
Melatonina	ELA	4 meses. 300 mg/día, por recto	↓ Proteínas carboniladas en suero	Weishaupt y col., 2006
Curcumina	Enfermedad de Alzheimer	6 meses. 0, 1 y 4 g/día	↑ Niveles plasmáticos de vitamina E y de A $\beta$ 40 → sugiere capacidad de desagregar los depósitos de A $\beta$ en el cerebro	Baum y col., 2008
		6 meses. 2-10 mg/día	Sin mejora significativa en función cognitiva o cambio en niveles de A $\beta$ , tau y tau-fosforilada en fluido cerebroespinal	Ringman y col., 2008
Epilagalocatequina galato	Enfermedad de Alzheimer	Fase II/III. 200-800 mg/día. No concluido.		Folch y col., 2015
Huperzina A	Enfermedad de Alzheimer	3 meses. 400 $\mu$ g/día	Mejora significativa de la actividad cognitiva, comportamiento y actividad diaria de los pacientes	Zhang y col., 2002

Tabla 8. Resumen de algunos compuestos antioxidantes de origen natural evaluados en ensayos clínicos de enfermedades neurodegenerativas.

Son numerosos los ensayos clínicos que se están llevando a cabo en los últimos años con compuestos antioxidantes de origen natural en pacientes de enfermedades neurodegenerativas (Mecocci y Polidori, 2012; Folch y col., 2015), y es factible que aparezcan resultados positivos en un futuro próximo.

#### 2.4.2. Mecanismos novedosos de neuroprotección

Además del aporte exógeno de compuestos antioxidantes, un creciente número de estudios en los últimos años se enfocan a investigar ciertos mecanismos intracelulares de neuroprotección que, a su vez, están en directa y estrecha interrelación con los eventos bioquímicos derivados del estrés oxidativo (ver Figura 11). Vamos a destacar los siguientes:

**Modulación del sistema Nrf2.** La vía de señalización intracelular Keap1-Nrf2-ARE se constituye como una importante diana para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, por su capacidad de regular el sistema antioxidante endógeno (Joshi y Johnson, 2012). El resultado último de la activación de esta vía es el de potenciar la transcripción de genes de enzimas antioxidantes y citoprotectoras de fase II (Kobayashi y Yamamoto, 2005), que aportarán a las neuronas una mayor resistencia frente al daño oxidativo. El papel neuroprotector de esta vía se ha demostrado en cultivos celulares del SNC y modelos animales deficientes para Nrf2 y que, comparando con células y animales con características normales, demostraron tener una mayor susceptibilidad a los efectos de compuestos citotóxicos y a la neurodegeneración (Calkins y col., 2005; Granado y col., 2011; Kärkkäinen y col., 2014).

Se ha descrito la capacidad de numerosos compuestos naturales para activar esta vía de señalización y ejercer así efectos protectores *in vitro* e *in vivo*. Los isotiocianatos, que son muy abundantes en ciertas plantas (de las familias *Brassicaceae* y *Moringaceae*), han presentado una interesante capacidad de activación del factor Nrf2 en modelos de diversas enfermedades neurodegenerativas (Giacoppo y col., 2015). Otras moléculas entre las que se incluyen triterpenos y diterpenos, y compuestos fenólicos más comunes (p. ej., la curcumina, el resveratrol y la epigallocatequina galato, entre otros) también han demostrado ser activos (González-Burgos y col., 2013; Buendia y col., 2016). Muchos de los activadores de esta vía presentan un carácter electrofílico (p. ej., por la presencia de grupos carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturados); se postula que pueden interaccionar con grupos nucleofílicos como los tioles de

los residuos de cisteína de la proteína Keap1, de forma que favorecen la liberación y posterior traslocación del factor Nrf2 (Balogun y col., 2003).

**Efecto protector específico a nivel de mitocondria.** La disfunción mitocondrial es una alteración intracelular común a diversas enfermedades neurodegenerativas, muy característica en las enfermedad de Parkinson y Alzheimer, y muchas veces consecuencia del propio estrés oxidativo en el SNC (Burté y col., 2015). La deficiencia de una adecuada biodinámica mitocondrial se caracteriza por la inhibición de la actividad de los complejos proteicos de la cadena de transporte electrónico con una mayor generación mitocondrial de ERO, pérdida del potencial de membrana y disrupción de su normal permeabilidad, pérdida de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  y oxidación del ADN mitocondrial, entre otros eventos (Ott y col., 2007; Reddy y Reddy, 2011). Todo ello resulta en un déficit energético y mayor muerte neuronal (Celsi y col., 2009). Se entiende, pues, que los compuestos capaces de ejercer protección de forma específica a nivel mitocondrial serán de interés como potenciales agentes neuroprotectores que favorezcan una mayor supervivencia neuronal (Procaccio y col., 2014). Así, numerosos estudios pre-clínicos han demostrado una interesante efectividad de ciertos fármacos dirigidos a mitocondria en modelos de enfermedades de Alzheimer y Parkinson (Fernández-Moriano y col., 2015c). Con este fin, se han modificado moléculas antioxidantes como la coenzima Q (asociación a cationes lipofílicos) para alcanzar un efecto antioxidante específico en la mitocondria (Tauskela, 2007). Numerosos compuestos naturales (p. ej., resveratrol, curcumina, melatonina, andalusol, lagascatriol, etc.) también han demostrado actividades neuroprotectoras mediados por efectos específicos a nivel de mitocondria, incluyendo entre otros el mantenimiento del potencial de membrana, potenciación de la SOD mitocondrial, la captación de ERO intra-mitocondriales y el mantenimiento de bajos niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  (González-Burgos y col., 2013b; Fernández-Moriano y col., 2015c; de Oliveira y col., 2016).

**Inhibición de la apoptosis a nivel del SNC.** La degradación del SNC en las enfermedades neurodegenerativas acontece principalmente por el proceso de apoptosis o muerte celular programada de las neuronas (Hisatomi y col., 2011). Este proceso se desencadena de forma mayoritaria como consecuencia de la disfunción mitocondrial (vía intrínseca de la apoptosis), y está estrechamente unido a la permeabilización de la membrana mitocondrial, que pueden liberar factores pro-apoptóticos como citocromo C y AIF (Galluzzi y col., 2009). Desde la década de los 90, se desarrolló la búsqueda de compuestos activos capaces de retardar/prevenir las enfermedades neurodegenerativas a través de la prevención

de la apoptosis; de conseguirlo de manera efectiva en el SNC de pacientes, se evitaría una mayor neurodegeneración (Robertson y col., 2000).

Se han identificado diversos compuestos capaces de inhibir la apoptosis neuronal en modelos *in vivo* e *in vitro* (frente al uso de neurotoxinas) de enfermedades neurodegenerativas a través de distintos mecanismos (Sureda y col., 2011; Trippier y col., 2013; Peri y col., 2016):

- compuestos antioxidantes que contrarrestan la disfunción mitocondrial,
- inhibición de enzimas caspasas,
- inhibición de calpaínas,
- inhibición de GSK-3 $\beta$  (*glycogen synthase kinase 3 beta*),
- activación de receptores estrogénicos,
- inhibición del ciclo celular en distintas etapas,
- inhibición de la síntesis de colesterol a nivel cerebral (estatinas),
- inhibición de la señalización intracelular por kinasas JNK (c-Jun N-Terminal Kinasa),
- inhibición de la neuroinflamación mediante la inhibición de COX-2 o la activación de receptores PPARs,
- antagonismo de los receptores NMDA y prevención de la excitotoxicidad del glutamato,
- y mediante efectos neurotróficos (p. ej., con NGF o BDNF).

**Modulación del mecanismo de autofagia en las células del cerebro.** La autofagia es el principal proceso de degradación intracelular que permite el reciclaje de orgánulos y proteínas citoplasmáticas deterioradas para mantener la homeostasis celular (Cuervo y col., 2005). Los mecanismos moleculares de este proceso (dependiente de lisosoma) han sido estudiados en detalle por el reciente Premio Nobel en Medicina (Ōsumi, 2001; Nobelförsamlingen, 2016).

En los últimos años, la autofagia se ha propuesto como un proceso clave en neuroprotección, ya que se ha demostrado afectada en las neuronas de pacientes de diversas enfermedades neurodegenerativas; así, una defectuosa autofagia en SNC impide la eliminación de proteínas anómalas como Tau o  $\alpha$ -sinucleína (Tan y col., 2014; Nah y col., 2015). Los compuestos antioxidantes, en general, no son capaces de revertir el daño oxidativo ya presente en biomoléculas (con excepciones, como los sistemas enzimáticos de reparación de ADN), sino sólo prevenir un daño futuro. La eliminación de las moléculas dañadas corre a cargo de la autofagia intracelular, de forma que actúa como un mecanismo antioxidante (Giordano y col., 2013). Además, es el único mecanismo conocido que permite el reciclaje mitocondrial, degradando las mitocondrias dañadas/disfuncionales en las vesículas lisosomales. La autofagia mitocondrial (mitofagia) está regulada por proteínas como PINK1 y

Parkin (mutaciones a nivel de estas proteínas desencadenan la enfermedad de Parkinson) y, cuando no es efectiva, la disfunción mitocondrial conlleva a la apoptosis neuronal (Kamat y col., 2014; Pellegrino y Haynes, 2015).

Por tanto, se comprende la relevancia de mantener una autofagia efectiva (o potenciarla en caso que esté disminuida) en las células del SNC como una prometedora estrategia de neuroprotección. Se han identificado numerosos compuestos naturales como activadores de la autofagia en estudios pre-clínicos de enfermedades neurodegenerativas (Huang y Adachi, 2016). Entre ellos, destacan compuestos como el kaempferol, resveratrol, quercetina y celastrol, que han demostrado ejercer una significativa activación de la autofagia protectora en modelos celulares del SNC sometidos a daño oxidativo (Wu y col., 2011; Filomeni y col., 2012; Deng y col., 2013; Kim y col., 2013).



### **3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL TRABAJO**

Las enfermedades neurodegenerativas suponen un alto grado de deterioro en la calidad de vida de los pacientes y, con ello, un elevado coste sanitario y social. El envejecimiento progresivo de la población (por el aumento de la esperanza de vida) y ciertos hábitos de vida en la sociedad actual actúan como los principales factores de riesgo en la prevalencia de las dichas enfermedades, que está aumentando de forma preocupante (Shany-Ur y Rankin, 2011; Dorsey y col., 2013).

El impacto de las enfermedades neurodegenerativas en la sociedad se ve agravado por la falta de terapias realmente eficaces para su tratamiento, en contra de lo que ocurre con otro tipo de patologías. Los fármacos actualmente comercializados para el tratamiento de estas enfermedades, entre las que se incluyen la enfermedad de Parkinson y de Alzheimer, sólo consiguen reducir los síntomas cognitivos o motores en mayor o menor grado, pero no revierten la situación clínica debida a la excesiva muerte neuronal (Stanzione y Tropepi, 2011; Niedzielska y col., 2016). La investigación farmacológica en este campo requiere, por tanto, comprender mejor las causas de las diversas patologías, cuyo conocimiento es aún difuso en comparación con otras enfermedades (Zhang y col., 2014).

La fisiopatología de estas enfermedades está íntimamente unida a la contribución y los efectos moleculares del estrés oxidativo, entendido como la ruptura del balance entre pro-oxidantes y antioxidantes intracelulares. El estrés oxidativo actúa como causa y/o consecuencia en la patogenia de las enfermedades neurodegenerativas. A nivel de las células del SNC, esta situación provoca afectación de todas las biomoléculas, desde lípidos de membrana al ADN nuclear, que resulta en disfunción del metabolismo energético y desemboca en la muerte neuronal. Además, cabe destacar que las células del SNC son muy susceptibles al daño oxidativo por sus peculiares características de elevado consumo de oxígeno y reducidas defensas antioxidantes.

Los compuestos antioxidantes capaces de contrarrestar, mediante su aporte exógeno, el daño oxidativo celular a nivel del SNC, y de proteger frente a la muerte neuronal por diferentes mecanismos pueden convertirse en potenciales candidatos para prevenir o retardar la aparición de los síntomas de las enfermedades neurodegenerativas (Lalkovičová y Danielisová, 2016). A este respecto, la naturaleza es una fuente excepcional de compuestos farmacológicamente activos y de interés en la terapéutica de este tipo de enfermedades (Numakawa, 2014). Han sido numerosos los compuestos naturales que han mostrado

resultados muy prometedores en diversos modelos *in vitro* e *in vivo* de enfermedades neurodegenerativas; pero son muy escasos aquellos que han pasado las fases pre-clínicas y cuya eficacia ha podido confirmarse en ensayos clínicos (Steinhubl, 2008; Kim y col., 2015). En la problemática del descubrimiento de nuevas terapias frente a estas enfermedades influye enormemente la complejidad de la fisiología cerebral y la dificultad de las moléculas de acceder al SNC a través de la BHE, algo que debe tenerse muy en cuenta en futuras investigaciones en este campo (Wong y col., 2014).

Así pues, el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas puede considerarse uno de los principales retos terapéuticos del presente siglo. Resulta imprescindible la búsqueda de nuevos compuestos activos que permitan descubrir fármacos para mejorar las herramientas terapéuticas disponibles frente a dichas enfermedades.

En comparación con otros grupos de organismos (como plantas superiores u hongos de vida libre), el conocimiento de las propiedades farmacológicas de los líquenes y sus metabolitos bioactivos es escaso. En las últimas dos décadas han surgido numerosos estudios que han demostrado la presencia de diversos compuestos con interés farmacológico (Gómez-Serranillos y col., 2014; Rankovic, 2014). Pero, a pesar de ello, el conocimiento sobre sus propiedades antioxidantes continúa sin desarrollarse de forma notable y casi nada se conoce de las actividades neuroprotectoras de los metabolitos liquénicos.

Por todo lo expuesto anteriormente, y enmarcado dentro de la línea de trabajo colaborativa entre nuestros grupos de investigación “Farmacología de Productos Naturales” y “SYSTEMOL”, iniciamos este proyecto centrado en la identificación de compuestos antioxidantes con potencial neuroprotector en líquenes de la familia *Parmeliaceae*.

Los **objetivos** del presente trabajo de investigación se definen a continuación:

1. **Investigar el potencial citoprotector, basado en las propiedades antioxidantes, de seis especies de líquenes parmeliáceos [*Cetraria islandica*, *Cetrelia braunsiana*, *Evernia prunastri*, *Parmotrema saccatilobum*, *Usnea ghattensis* y *Vulpicida canadensis*], sobre modelos celulares de neurona (línea celular SH-SY5Y, derivada de neuroblastoma humano) y de astrocito (línea celular U373-MG, derivada de astrocitoma humano) en situaciones de estrés oxidativo.**
  - Determinar la capacidad de captación de ERO y el contenido en polifenoles.

- Determinar sus efectos sobre diferentes marcadores de estrés oxidativo que se ven alterados por un tratamiento celular con  $H_2O_2$ , que actúa como inductor de daño oxidativo.

Evaluaremos sus efectos a nivel de:

- Viabilidad y morfología celular.
- Marcadores de daño oxidativo: producción intracelular de ERO, niveles de MDA como subproducto de la peroxidación lipídica y concentraciones intracelulares de GSH.

**2. Realizar un estudio fitoquímico del extracto metanólico de dichas especies con el fin de identificar y aislar sus componentes mayoritarios responsables de la actividad biológica.**

**3. Evaluar el potencial neuroprotector *in vitro* y el posible mecanismo de acción de los principales metabolitos secundarios aislados sobre los modelos de células del SNC en situaciones de daño oxidativo.**

- Evaluar sus efectos sobre viabilidad y morfología celular, y sobre los marcadores de EO.
- Investigar su capacidad de ejercer un efecto protector sobre la disfunción mitocondrial debida al daño oxidativo y de potenciar los sistemas antioxidantes enzimáticos.
- Elucidar el posible papel que tienen ciertos mecanismos de citoprotección, tales como la vía de señalización mediada por el factor Nrf2 o el mecanismo de autofagia, en las acciones farmacológicas de los metabolitos liquénicos.
- Estimar su capacidad de difusión a través de la BHE.

**4. Secuenciar el genoma completo del micobionte de las especies y anotar los posibles *clusters* de genes biosintéticos responsables de la síntesis de metabolitos secundarios de mayor interés farmacológico.**

El **objetivo final** del presente trabajo consiste en aportar nuevos conocimientos sobre las propiedades farmacológicas de los compuestos liquénicos, y de su potencial para actuar como agentes neuroprotectores capaces de contrarrestar o prevenir el daño oxidativo en las células del SNC. La obtención de resultados interesantes podría presentar nuevos compuestos como potenciales candidatos en la investigación de nuevas terapias de enfermedades neurodegenerativas.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**

-----

# 1. MATERIAL

## 1.1. Material liquénico

El material biológico utilizado para la realización del trabajo está representado por seis especímenes de líquenes de la familia *Parmeliaceae*, recolectados en diferentes épocas y lugares geográficos. Los ejemplares fueron autenticados taxonómicamente por la Dra. Ana M. Crespo y el Dr. Pradeep K. Divakar (Departamento de Biología Vegetal II), y depositados en el herbario de la Facultad de Farmacia (MAF). Los datos identificativos de cada uno de ellos se presentan en la siguiente Tabla 9.

La selección de la seis especies se basa en los resultados obtenidos de un *screening* de actividad antioxidante realizado sobre extractos de especímenes correspondientes a 29 especies de *Parmeliaceae* (Fernández-Moriano y col., 2015b).

ESPECIE	LUGAR Y FECHA DE RECOLECCIÓN	Código MAF
<i>Cetraria islandica</i> (L.) Ach.	Popradské pleso, Poprad, Presovsky Kraj, (Eslovaquia), agosto 2006	MAF-LICH 16948
	Riofrío de Riaza, Segovia (España), diciembre 2015	MAF-LICH 17201
<i>Cetrelia braunsiana</i> (Müll. Arg.) W.L. Culb. & C.F. Culb.	W. Himalaya, Knoschula Khark (India), agosto 2006	MAF-LICH 16943
<i>Evernia prunastri</i> (L.) Ach.	New Forest (Inglaterra), septiembre 2010	MAF-LICH 16930
<i>Parmotrema saccatilobum</i> (Taylor) Hale	Isla Chichi-jima, islas Bonin (Japón), junio 2009	MAF-LICH 16928
<i>Usnea ghattensis</i> G. Awasthi	Tamil Nadu, Ghat, Nilgiri Hills (India), enero 2008	MAF-LICH 16944
<i>Vulpicida canadiensis</i> (Räsänen) J.-E. Mattson & M.J. Lai	Cold Spring campground, Jefferson County, Oregón (EEUU), mayo 2010	MAF-LICH 4263

Tabla 9. Datos identificativos de los seis especímenes de *Parmeliaceae* utilizados.

Tal y como se detalla más adelante, los compuestos liquénicos utilizados para evaluar su actividad farmacológica son: atranorina, ácido evérnico, ácido fumarprotocetrárico y ácido úsnico.

## **1.2. Líneas celulares**

Para los distintos experimentos desarrollados a lo largo del estudio, se han utilizado varias líneas celulares que presentan diferentes propiedades y morfologías, como se detalla a continuación (Figura 13).

### **1.2.1. Líneas utilizadas en el estudio de la actividad antioxidante y neuroprotectora**

- **SH-SY5Y**

Las células SH-SY5Y fueron proporcionadas por la Unidad de Cultivos del CAI (Centro de apoyo a la investigación) de Medicina y Biología de la Universidad de Alcalá (Madrid, España). Es una línea celular resultado de una triple clonación de la línea SK-N-SH, que derivó en su origen de neuroblastoma humano. La línea celular SH-SY5Y presenta marcadores neuronales de actividad enzimática (tirosina y dopamina hidroxilasas), captación específica de noradrenalina y gran capacidad de diferenciación bajo distintos tratamientos (p. ej., con ácido retinoico se diferencian a un fenotipo neuronal colinérgico) (Xie y col., 2010). Su capacidad de proliferar en cultivo durante largos períodos sin contaminación la convierte en una línea celular comúnmente utilizada en el estudio de la función neuronal y mecanismos moleculares (Newhouse y col., 2004; Suwanjang y col., 2016). Adoptan una morfología relativamente triangular o poligonal con pequeñas prolongaciones (neuritas) y crecen tendiendo a formar agrupaciones; no presentan una excesiva adherencia.

- **U373-MG**

Línea celular facilitada por la Unidad de Cultivos del CAI de Medicina y Biología de la Universidad de Alcalá (Madrid, España). Es una línea derivada de astrocitoma-glioblastoma cerebral humano (Prat y col., 2000). Los astrocitos individuales presentan aspecto estrellado, morfología epitelial y crecen en monocapa, firmemente adheridos a la superficie de la placa/frasco de cultivo.

### **1.2.2. Líneas utilizadas para el estudio de paso a través de BHE**

- **RBE4**

Las células RBE4 fueron cedidas por el Dr. Pierre O. Couraud del Instituto Cochin, Instituto Nacional de Salud e Investigación Médica (INSERM) de París (Francia). Es una línea celular muy bien caracterizada como células endoteliales de cerebro de mamíferos. Deriva de células de endotelio de la microcirculación cerebral de rata, que han sido posteriormente

inmortalizadas. Crecen muy bien adheridas a la superficie de cultivo formando una monocapa, y expresan propiedades específicas de la BHE, incluidos marcadores enzimáticos (p. ej., fosfatasa alcalina y glutamiltranspeptidasa) y transportadores (p. ej., glicoproteína P y GLUT1) (Roux y Couraud, 2005), por lo que se usa a menudo en estudios bioquímicos de BHE.

- **hCMEC/D3**

La línea celular hCMEC/D3 se adquirió de la empresa Tebu-Bio (Le Perray En Yvelines, France). Se trata de una línea celular desarrollada recientemente que reproduce muchas de las características clave de las células endoteliales primarias del cerebro humano de las cuales deriva (p. ej., uniones celulares estrechas, expresión de transportadores específicos, elevada TEER, etc.), sin necesidad de co-cultivarse con células gliales (Weksler y col., 2013). Surge como un modelo de BHE con propiedades adecuadas para la investigación farmacológica; en concreto, para estudios *in vitro* de transporte de fármacos (Poller y col., 2008).

### **1.2.3. Líneas utilizadas para el estudio del potencial anticancerígeno**

- **HepG2**

Las células HepG2 derivan de carcinoma hepatocelular humano bien diferenciado. Es una línea celular inmortalizada de células epiteliales en morfología y que crecen profusamente en cultivo. Se usan para distintos tipos de investigaciones en modelos hepáticos *in vitro*, entre ellas para la investigación de compuestos anticancerígenos (Lu y col., 2007).

- **MCF-7**

Esta línea celular fue establecida en 1973 y deriva de cáncer de mama humano. Supuso un gran avance para el estudio inicial *in vitro* de este tipo de tumores. Su fenotipo corresponde al de células del epitelio mamario luminal, que presentan receptores de estrógenos y progesterona (Simstein y col., 2003). Ambas líneas celulares cancerígenas se obtuvieron del NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell line Repository (Frederick National Laboratory for Cancer Research, National Cancer Institute, EEUU).

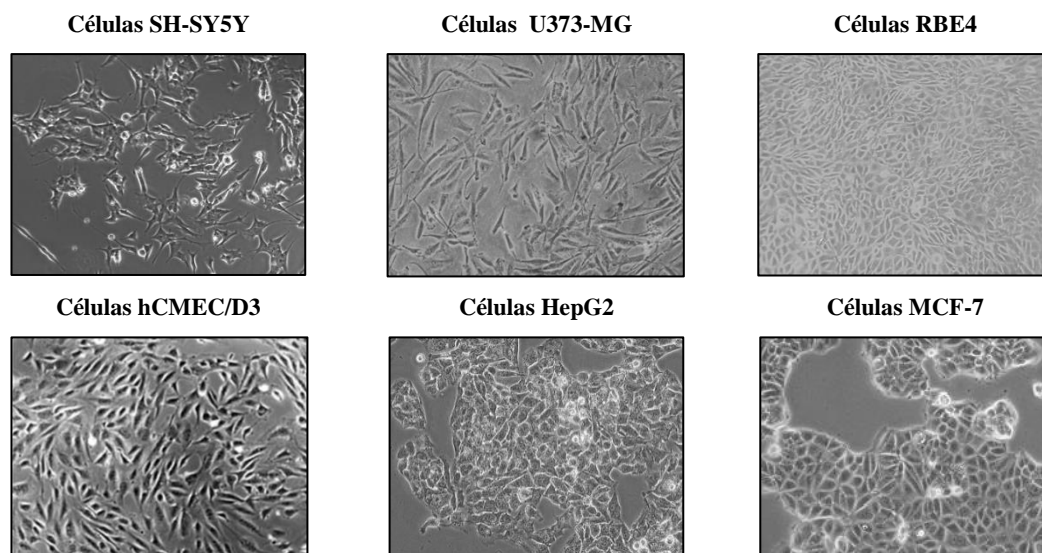


Figura 13. Microfotografías representativas de la morfología de las líneas celulares utilizadas.

### 1.3. Equipos de laboratorio, material fungible y reactivos químicos

Durante el desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral se han utilizado los siguientes **equipos de laboratorio**:

- Agitadores: agitador asimétrico orbital-balance “3D” (Boeco, Alemania), agitador orbital modelo GFL 3005 (Burgwedel, Alemania) y agitador magnético con control de temperatura modelo ARE (VELP Scientifica, Italia).
- Balanzas: modelo KERN EMB 500-1 de sensibilidad  $\pm 0,1$  g (Balingen-Frommern, Alemania) y balanzas de precisión modelo Sartorius BP150 (Sartorius, Madrid, España) de sensibilidad  $\pm 0,001$  g y modelo AJ100 con sensibilidad  $\pm 0,0001$  g (Mettler, Suiza).
- Baño de agua termostatzado: modelo UNITRONIC 320OR con agitación (Selecta Precistern, Barcelona, España).
- Cámara digital Moticam 2500 (MOTIC, China).
- Centrífugas: modelo 5430 R (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), modelo Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge y modelo Sorvall RT 6000 (Du Pont Instrument, España).
- Congelador ( $-80^{\circ}\text{C}$ ): modelo FORMA 88000 Series (Thermo Scientific, MA, EEUU).
- Cromatógrafo para cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC): modelo Agilent 1200 Infinity (Agilent Technologies, CA, EEUU), equipado con detector de diodo array.
- Espectrofotómetros: modelo UV-Vis UVIKON 930 (Kontron Instruments, Italia) y modelo SPECTRAmax 384 Plus, Molecular Devices (Sunnyvale, EEUU).



- Fluorímetros: lector de microplacas FLx800 (Biotek Instruments Inc., Vermont, EEUU) y espectrofluorímetro de microplacas FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Alemania).
- Frigorífico y congelador (-20°C) (Balay, España).
- Lector de absorbancia en microplacas: modelo Digiscan 340 Asys HITECH (GMBH, Alemania), y modelo SPECTROstar Nano (BMG Labtech, Alemania).
- pH-metro: modelo Basic 20 (Crison Instruments, España).
- Sonicador Ultrasonic Processor Modelo UP50H Dr. Hielscher (GMBH, Alemania).
- Agitador vórtex: modelo Bunsen (Nessler, España).
- Detector de quimioluminiscencia: Image Quant LAS 500 (GE Health Care Life Sciences, Madrid, España).

**Material fungible de carácter general:**

- Pipetas: modelos monocal de 10-100 y 100-1000 µl, y multicanal de 5-50 µl de BioPette (Labnet, USA); y modelos monocal de 0,5-10 µl y multicanal de 50-300 µl de Boeco (Boeco, Alemania).
- Eppendorfs de 0,5, 1,5 y 2 ml (Sarsdtedt, Alemania).
- Placas de 24 y 96 pocillos, y placas cc 100/20 (Sarsdtedt, Alemania).
- Pipetas serológicas de 10 ml (Sarsdtedt, Alemania).
- Tubos Falcon estériles de 15 ml y 50 ml (Sarsdtedt, Alemania).

**Equipos y material específico para cultivos celulares:**

- Autoclave: modelo Trace Raypa Steam Sterilizer STERICLAV-S (Raypa, España).
- FastPette-Pro autoclavable (Labnet, NJ, EEUU).
- Congelador de nitrógeno líquido modelo 35VHC (Taylor-Wharton, Alemania).
- Cabinas de flujo laminar: modelos de flujo vertical MDC Advantage (Thermo Scientific) y modelo BV-100 (Telstar Industrial, Barcelona, España).
- Incubador termostatzado con aporte de CO<sub>2</sub>, modelo Heracell 150 (Thermo Electron Corporation, España).
- Microscopio óptico de fase invertida (NIKON TMS, Japón).
- Pipetas de 10 ml estériles, frascos de cultivo estériles, placas petri y placas de 24 y 96 pocillos estériles, tubos Falcon estériles de 15 y 50 ml (Sarsdtedt, Alemania).

## Reactivos químicos:

La mayoría de los productos químicos empleados en este trabajo han sido suministrados por los siguientes proveedores: Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EEUU), Panreac Química S.A. (Barcelona, España), Invitrogen y Gibco (Paisley, Reino Unido), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EEUU), y Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EEUU).

A continuación, se enumeran los principales reactivos químicos utilizados:

- 2,2'-azobis (2-amidinopropano)-dihidrocloruro (AAPH) (Sigma-Aldrich).
- 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich).
- 2,7-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich).
- Ácido bincinónico (Sigma-Aldrich).
- Antiproteasas: leupeptina, PMSF y pepstatino (Sigma-Aldrich).
- Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich).
- Dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich).
- EDTA (Sigma-Aldrich).
- Essential Medium  $\alpha$ -MEM (Gibco).
- FCCP y oligomicina (Tocris, Reino Unido).
- Gentamicina 10 mg/ml (Gibco).
- Glicerol (Sigma-Aldrich).
- Glutación disulfuro (GSSG) (Sigma-Aldrich).
- Glutación reducido (GSH) (Sigma-Aldrich).
- Ionóforo A23187 (Tocris, Reino Unido).
- Ionomicina (Tocris, Reino Unido).
- Lucifer Yellow (Sigma-Aldrich).
- Medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Gibco).
- Medio de cultivo EBM-2 (*Endothelial Growth Basal Medium*) (Lonza, Basilea, Suiza)
- Medio de cultivo Glutamax (Sigma-Aldrich).
- Medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco).
- Anticuerpos: anti SOD-1 (sc-11407), anti SOD-2 (sc-30080), anti CAT (sc-50508), anti GR (sc-32886), anti GPx (sc-30147), anti HO-1 (sc-10789), anti Nrf2 (sc-722), anti TFIIIB (sc-271784) y anti-IgG de conejo (sc-2004) (Santa Cruz Biotechnology). Anti  $\beta$ -actina (A2228), anti-IgG de ratón (A9044) y anti-LC3B (L7543) (Sigma-Aldrich).
- $MnCl_2$  (Sigma-Aldrich).
- $NaH_2PO_4$  y  $Na_2HPO_4$  (Panreac).
- NADH (Sigma-Aldrich).
- $NH_4Cl$  (Sigma-Aldrich).
- O-ftaldehído (OPT) (Sigma-Aldrich).
- Piruvato sódico (Sigma-Aldrich).
- Rhod-2/AM e Indo-1/AM (Thermo Fisher).
- Solución 30% v/v de  $H_2O_2$  (Sigma-Aldrich).
- Solución de HEPES 10 mM (Sigma-Aldrich).
- Sulfato de cobre (II) (Sigma-Aldrich).
- Sustato de caspasa-3 Ac-DEVD-AMC (Sigma-Aldrich).
- Tampón fosfato (PBS) con calcio y magnesio, y PBS sin calcio y sin magnesio (Gibco).
- Tetrametilrodamina (TMRM) (Biotium Inc., CA, EEUU).
- Tripsina-EDTA (Gibco).
- Tritón X-100 (Sigma-Aldrich).
- Trolox (Sigma-Aldrich).
- Ácido fosfórico (Sigma-Aldrich).
- Medio de cultivo Hams F-10/ $\alpha$ -Minimum (Gibco).
- Metanol HPLC supergradiente (Panreac).
- NaF (Sigma-Aldrich).
- Ortovanadato (Sigma-Aldrich).
- Pirofosfato sódico (Sigma-Aldrich).
- Reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich).
- Suero fetal bovino (Gibco).

## 2. MÉTODOS

### 2.1. Estudio fitoquímico

#### 2.1.1. Preparación de los extractos liquénicos

Se prepararon los extractos metanólicos siguiendo el protocolo descrito por De Paz y col. (2010b), con modificaciones. Los talos liquénicos secos se pesaron (aproximadamente 50 mg) y fueron extraídos en metanol (2 ml, calidad HPLC supergradiente) durante 2 h, en frascos pequeños de vidrio. La técnica de la extracción fue una maceración a temperatura ambiente (20-22°C) y con agitación en vórtex durante 1 min cada 30 min. Después, los extractos se filtraron a través de filtros de nylon de 0,45 µm de tamaño de poro y se llevaron a sequedad (evaporación del solvente a temperatura ambiente). Tras esto, se pesaron los residuos secos y se calcularon los rendimientos (% peso residuo seco/peso del talo liquénico). Los extractos secos se conservan, adecuadamente etiquetados, en nevera a 4°C y protegidos de la luz hasta su uso.

#### 2.1.2. Contenido de compuestos fenólicos

El contenido total de compuestos fenólicos solubles en los extractos liquénicos se determina por el **método de Folin-Ciocalteu**, utilizando ácido gálico (AG) como compuesto fenólico patrón (Saura-Calixto y col., 2007). Éste método se basa en la reacción de los compuestos fenólicos con el reactivo de Folin (mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato) a pH básico dando lugar a una coloración azul que es susceptible de ser determinada espectrofotométricamente. Éste reactivo no sólo reacciona con fenoles totales sino también con otras sustancias reductoras y, en consecuencia, permite estimar la capacidad reductora total de una muestra (Singleton y col., 1999). Numerosos estudios han evidenciado la actividad antioxidante de los compuestos polifenólicos en distintos sistemas biológicos (Landette, 2013; Kim y col., 2014).

El **procedimiento** del ensayo se inicia mezclando 0,5 ml del extracto liquénico (concentración de 1 mg/ml en metanol) con 0,5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu. Posteriormente, se añaden 10 ml de una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (75 g/l) y 14 ml de agua destilada (volumen final de 25 ml en un tubo Falcon). La mezcla se agita durante 1 min y se incuba durante 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, se mide la absorbancia a 760

nm en un espectrofotómetro Uvikon 930. El dato de absorbancia se interpola en una recta patrón de ácido gálico y los resultados se expresan como  $\mu\text{g AG/mg}$  muestra.

### 2.1.3. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Con el objetivo de identificar los componentes de los distintos extractos liquénicos se lleva a cabo un análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC - *high performance liquid chromatography*). Para ello, los extractos secos se regeneran en metanol a una concentración de  $250 \mu\text{g/ml}$  y se analizan en un cromatógrafo Agilent 1200 Infinity (Figura 14), en las condiciones previamente descritas (Fernández-Moriano y col., 2015a). Se utiliza una columna analítica de fase reversa Mediterranea Sea C18 ( $150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$ ,  $3 \mu\text{m}$  tamaño de partícula; Teknokroma, Barcelona, España). La fase móvil consiste en 1% de ácido fosfórico en agua mili-Q (solvente A) y metanol calidad HPLC supergradiente (solvente B, Panreac), y eluye a  $0,6 \text{ ml/min}$  en un método de gradiente: de 70% de A a tiempo inicial (0 min) a 30% de A tras 15 min y hasta 10% de A a los 45 min; las condiciones iniciales se recuperan a los 65 min. Los solventes son previamente filtrados a vacío por filtros de  $0,45 \mu\text{m}$  de tamaño de poro. El volumen de muestra inyectada es de  $20 \mu\text{l}$  y la temperatura del análisis se establece en  $40^\circ\text{C}$ . Todo el análisis es monitorizado mediante un detector de fotodiodo array (entre 190-800 nm) con lámpara de luz UV, de forma que se adquiere el espectro entre 190 y 400 nm para todos los compuestos registrados en el cromatograma. Los cromatogramas de referencia se presentan a 254 nm. El software utilizado para el procesamiento de datos cromatográficos es Agilent ChemStation.

La identificación de los distintos metabolitos que se corresponden con los registros de los cromatogramas se consigue por comparación de los datos espectroscópicos (máximos de absorbancia) con los publicados en la literatura científica (Yoshimura y col., 1994b), así como de los tiempos de retención de compuestos puros utilizados como patrones. Se utilizan los siguientes compuestos patrones: ácido protocetrárico aislado de *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale, ácido fumarprotocetrárico aislado de *Bryoria* sp., ácido pinástrico de *Cetraria pinastri* (Scop.) S.Gray., ácido vulpínico de *Letharia vulpina* (L.) Hue., ácido estíctico de *Parmotrema perlatum* (Huds.) Choisy. Ácido úsnico y atranorina se adquirieron en Sigma-Aldrich. Además, se utiliza el extracto de *Parmotrema nilgherrense* (Nyl.) Hale, que se conoce que presenta ácido alectorónico y ácido  $\alpha$ -colatólico.



Figura 14. Fotografía del cromatógrafo de HPLC modelo Agilent 1200 Infinity usado para el análisis fitoquímico de los extractos de líquenes parmeliáceos.

#### 2.1.4. Aislamiento de los metabolitos secundarios

El aislamiento de los dos metabolitos de interés (ácido evérnico y ácido fumarprotocetrárico) se lleva a cabo a partir de los extractos de *Evernia prunastri* y *Cetraria islandica*, respectivamente. Una vez identificados éstos y determinado sus tiempos de retención, se aíslan mediante un método de HPLC semi-preparativo con el mismo cromatógrafo Agilent 1200. En este caso, se utiliza una columna específica semi-preparativa Tracer Extrasil ODS2 (250 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m tamaño de partícula; Teknokroma). Las condiciones del método cromatográfico son similares a las descritas anteriormente, extrapoladas y adaptadas a análisis semipreparativo: se modifica el volumen de inyección (1 ml) y el flujo, que se aumenta a 2,5 ml/min. Estas condiciones permiten mantener constantes los mismos tiempos de retención para cada compuestos con la nueva columna. Las demás condiciones referentes a composición de solventes, gradiente de elución, temperatura y longitud de onda de detección son idénticas a las descritas en el apartado anterior. Los extractos metanólicos de *E. prunastri* y *C. islandica* se inyectan a la concentración de 1 mg/ml.

Los compuestos aislados se obtienen disueltos en una mezcla de agua/metanol, que será liofilizada. Una parte del residuo seco obtenido se re-disuelve en metanol y se analiza por el método analítico de HPLC (punto 2.1.3.) para confirmar su identidad y verificar su pureza. Para ello, se comparan los datos espectroscópicos y tiempos de retención de los metabolitos aislados con aquéllos de los compuestos en los extractos.

Además, se confirma la identidad de los compuestos aislados mediante la obtención de sus espectros de resonancia magnética nuclear (RMN)  $^1\text{H}$ , usando un Bruker AC-250 (Bruker, MA, EEUU). Los valores de desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se presentan en partes por millón (ppm) relativos a DMSO- $d_6$  ( $^1\text{H}$ :  $\delta$  2.50 ppm).

## **2.2. Cultivos celulares**

### **2.2.1. Condiciones de cultivo**

**Líneas celulares SH-SY5Y y U373-MG.** Se mantienen en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) para su desarrollo apropiado, en placas Petri 100/20 cc y frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (Sarstedt), respectivamente. El medio DMEM (Gibco) contiene glucosa (5 g/l), L-glutamina, HEPES 25 mM y no contiene piruvato. Antes de su uso, se suplementa con 0,5% de gentamicina (10 mg/ml; Gibco) y suero fetal bovino (FBS) (Gibco). El FBS se adiciona al 10% para promover el crecimiento celular y al 1% cuando sólo se pretende mantener el cultivo sin demasiado crecimiento, como es el caso de los tratamientos celulares. Los frascos/placas con los cultivos se mantienen en un incubador con condiciones uniformes de temperatura y composición atmosférica: 37°C, y 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>. Se supervisa el crecimiento de las células cambiando el medio y añadiendo medio fresco cada 2-3 días, y se realizan "pases" (ver la técnica en el siguiente apartado 2.2.2.) al alcanzar el 80-90% de confluencia.

**Línea celular RBE4.** Se desarrolla en frascos de cultivo pequeños (25 cm<sup>2</sup>), en los que previamente se ha añadido una solución de colágeno de rata (Sigma-Aldrich), para favorecer su adherencia. El frasco se lava dos veces con PBS (sin Ca<sup>2+</sup> y sin Mg<sup>2+</sup>) para eliminar restos de colágeno previamente a la adición del medio y las células. Las condiciones de mantenimiento del cultivo en cuanto a temperatura y atmósfera circundante son las mismas, si bien el medio de cultivo empleado difiere: se utiliza el medio Hams F-10/ $\alpha$ -Minimum Essential Medium ( $\alpha$ -MEM) (Gibco, Invitrogen), mezclado con Glutamax (1:1) (Sigma-Aldrich), y se adiciona un 10% de FBS, 0,5% de gentamicina y factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF, 1 ng/mL) (Boehringer, Ingelheim, Alemania). Del mismo modo, el medio de cultivo se cambia cada 2 días y se realizan pases celulares al alcanzarse el 80% de confluencia celular en la monocapa.

**Línea celular hCMEC/D3** (modelo de BHE). Crece en placas Petri 100/20 cc pre-tratadas con colágeno de rata por un tiempo mínimo de 3 h. El medio de cultivo es el EBM-2 (Endothelial Growth Basal Medium; Lonza, Basilea, Suiza) suplementado con 5% de FBS, 1% de

penicilina/estreptomicina, HEPES 10 mM, bFGF (1 ng/ml), hidrocortisona 1,4  $\mu$ M, ácido ascórbico 5  $\mu$ g/ml y concentrado lipídico químicamente definido 1/100 (Sigma-Aldrich). El resto de condiciones para el mantenimiento de las placas son las mismas que para las líneas celulares anteriores. Para los distintos ensayos con las células RBE4 y hCMEC/D3, las placas de 24 y 96 pocillos también se revisten durante 3 h con colágeno para favorecer su adherencia.

Las **células HepG2 y MCF-7** crecen en frascos de cultivo grandes (75 cm<sup>2</sup>) con medio RPMI-1640 (Gibco, Invitrogen) suplementado con 10% de FBS y 0,5% de gentamicina, en incubador con atmósfera húmeda de 5% CO<sub>2</sub>/95% aire y a temperatura de 37°C. El medio se cambia cada 2-3 días, y se realizan pases cuando se alcanza confluencia celular del 80-90%.

### **2.2.2. Técnicas de subcultivo celular**

El subcultivo celular (realización de “**pases celulares**”) es necesario cuando las células alcanzan un elevado grado de confluencia (80-90%) para que mantengan las condiciones óptimas de crecimiento y división celular. El proceso se inicia con la eliminación del medio de cultivo del frasco o placa y el lavado con PBS sin Ca<sup>2+</sup> y sin Mg<sup>2+</sup> para eliminar los restos del medio. La posterior adición de una solución de Tripsina-EDTA (Gibco) e incubación durante 3 min a 37°C permite levantar las células que dejan de estar adheridas a la superficie de cultivo. Una vez que las células están en suspensión, hay que inactivar la tripsina con la adición de 10 ml de medio (el adecuado para cada línea celular). El contenido se transfiere a un tubo Falcon que se centrifuga durante 5 min a 1500 rpm, de manera que se obtiene un pellet celular y se elimina el sobrenadante. Se re-suspenden las células en 10 ml de medio fresco y esa suspensión celular es la que se añade a un nuevo frasco o placa para continuar su crecimiento o para la siembra en placas de pocillos según los distintos experimentos, llevándose de nuevo al incubador. En ambos casos, es necesario conocer el número de células viables que se siembran, mediante la técnica de conteo celular. En general, en el presente trabajo se han utilizado las líneas celulares como máximo hasta el pase número 20, excepto las células hCMEC/D3 que en el momento de su recepción están ya en un pase número 25 y que, por tanto, se utilizan en pases de 25 a 35.

El **recuento celular** se realiza mediante el uso de la cámara de Neubauer y del colorante azul tripán (Sigma-Aldrich), que tiñe selectivamente las células muertas mientras que las células vivas (con una membrana citoplasmática intacta) no incorporan el colorante y se observan sin teñir y refringentes. La suspensión de células se deposita en el interior de la

cámara de Neubauer en dilución conocida (1:10), contándose el número de células vivas presentes en 5 cuadrantes de la cámara con el fin de obtener la media. La conversión del número de células en la cámara a células/ml se realiza mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Nº de células totales} = \frac{\text{nº células viables} \times 10^4 \times \text{Factor de dilución} \times \text{Volumen suspensión}}{5 \text{ cuadrantes}}$$

El número o densidad de células requeridas para cada experimento se especifica en los apartados correspondientes.

### **2.2.3. Congelación/descongelación de líneas celulares**

La **congelación** de las células permite conservarlas durante largos períodos de tiempo (meses-años). Para ello, el pellet celular que se obtiene al final del proceso de subcultivo se re-suspende en una solución de suero fetal bovino con glicerol al 10%. El glicerol actúa como agente crioprotector al penetrar en las células evitando la formación de cristales de hielo que afecten a la integridad de los orgánulos y membranas celulares. La congelación debe ser un proceso gradual, para minimizar el daño celular. Por ello, los viales se mantienen 24 h a -20°C y se transfieren a continuación a un congelador de -80°C, donde pueden mantenerse un tiempo máximo de 2-3 meses. Si se desea conservarlas un tiempo mayor, tras una semana a -80°C, los viales se sumergen en un tanque con nitrógeno líquido (-196°C).

Por el contrario, la **descongelación** debe ser rápida para evitar la formación de cristales de hielo durante la rehidratación. Por tanto, se pasan los viales directamente desde el congelador de -80°C o del tanque de N<sub>2</sub> líquido a un baño con agua a 37-40°C. Se vigila el proceso (aprox. 1 min es suficiente) y, una vez descongeladas, se re-suspenden las células en el medio de cultivo correspondiente. Se centrifugan (1500 rpm, 5 min) y se elimina el sobrenadante para eliminar los restos de glicerol, que puede ejercer toxicidad en cultivo. El pellet celular se vuelve a re-suspender en el medio de cultivo al 10% de FBS y se siembran las células en frascos o placas, que se incuban a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. A las 24 h, se cambia el medio de cultivo con el fin de eliminar las células no viables y los restos de glicerol. Tras 10 días desde su descongelación, las células ya pueden ser utilizadas para experimentación.

## **2.3. Tratamientos celulares**

Para los ensayos de actividad antioxidante y neuroprotectora en células SH-SY5Y y U373-MG, éstas se tratan con los extractos y metabolitos liquénicos en estudio a diferentes



concentraciones (según el experimento) y durante 24 h. Este tratamiento es previo a la exposición a peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

El tratamiento de las células HepG2, MCF-7, RBE4 y hCMEC/D3 con las muestras en estudio es también de 24 h (a menos que se especifique lo contrario en algún ensayo, como es el caso de los ensayos de cinética de captación por células endoteliales RBE4).

### **2.3.1. Preparación de las muestras**

En todos los experimentos desarrollados, los extractos secos y los compuestos liquénicos se disuelven en la mínima cantidad de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) que permite su solubilización, y se preparan soluciones stock en tampón fosfato salino con  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (PBS, Life Technologies) a concentraciones de 2 y 1 mg/ml. A partir de ellas, se realizan diluciones sucesivas en PBS para alcanzar las concentraciones deseadas en cada experimento.

Para los estudios de permeabilidad a través de BHE, las muestras se disuelven en DMSO y luego las diluciones se preparan en vehículo de transporte: HEPES 25mM en HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*, Sigma-Aldrich) y 0,1% de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich).

En todos los casos, la concentración de DMSO en contacto con las células en pocillo o placa es menor de 0,1% y no afecta a la viabilidad celular por sí mismo.

### **2.3.2. Modelo de estrés oxidativo**

El modelo de estrés oxidativo seleccionado para el presente trabajo se basa en la adicción exógena de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Sigma-Aldrich) a los cultivos derivados de células de SNC. La exposición a este agente estresante se hace durante un tiempo de incubación de 30 min y a concentraciones de 0,1 mM y 1 mM para las líneas SH-SY5Y y U373-MG, respectivamente. Estas condiciones, previamente puestas a punto por nuestro grupo de investigación (González-Burgos, 2012; Porres-Martínez, 2013), generan una reducción de la viabilidad celular en torno al 45%.

La utilización de  $\text{H}_2\text{O}_2$  como inductor de EO en modelos celulares de SNC está muy aceptada para estudios de neuroprotección, ya que altera diversos parámetros bioquímicos y mimetiza determinados eventos intracelulares que tienen lugar durante la degeneración celular propia de enfermedades neurodegenerativas (Gao y col., 2001; Zhang y col., 2010;

Nguyen Ho-Boulidoires y col., 2015). Cuando el  $\text{H}_2\text{O}_2$  permea al interior celular favorece la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), entre las cuales el radical hidroxilo será el mayor responsable del daño oxidativo a biomoléculas. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es capaz de originar radicales libres en presencia de iones hierro y mediante la reacción de Haber-Weiss ( $\cdot\text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$ ) y, de esta manera, provoca un incremento del EO y mayor generación de RL a nivel mitocondrial (Halliwell y Gutteridge, 2007), que reducirán la viabilidad celular.

## **2.4. Estudio farmacológico**

### **2.4.1. Determinación de la viabilidad celular y citotoxicidad**

#### **2.4.1.1. Ensayo de reducción del MTT**

La viabilidad celular se determina mediante el ensayo de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) siguiendo el método originalmente descrito por Mossman (1983), con modificaciones. Este método colorimétrico permite cuantificar la actividad metabólica de las células vivas en base a la capacidad de éstas de reducir la molécula de MTT por acción de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. El resultado de dicha reducción es la generación del compuesto formazán, en forma de cristales morados insolubles, cuya mayor o menor generación es directamente proporcional al número de células viables (Sargent, 2003). Este método permite evaluar el efecto de los extractos y metabolitos líquénicos sobre la funcionalidad e integridad de las mitocondrias como bioindicador de viabilidad celular.

El **procedimiento** se inicia con la siembra de células en placas de 96 pocillos, en una densidad de  $3 \times 10^4$  y  $5 \times 10^4$  células/pocillo para las líneas SH-SY5Y y U373-MG, respectivamente. Tras 24 h de incubación (células en torno al 90% de confluencia), las placas se tratan con diferentes concentraciones de extractos y compuestos (rango de 0,25 a 250  $\mu\text{g/ml}$ ), disueltos en medio con 1% de FBS. Se ensaya este amplio rango de concentraciones con el objetivo de seleccionar las que no generan toxicidad celular significativa y que serán estudiadas para evaluar su efecto citoprotector frente a estrés oxidativo. A continuación, se elimina el medio con tratamiento y se adicionan 100  $\mu\text{l}$ /pocillo de una disolución de MTT (Sigma-Aldrich) (2 mg/ml en PBS) en medio al 10% de FBS. Se incuban las placas durante 1 h a  $37^\circ\text{C}$  y los cristales de formazán generados se disuelven por adición de 100  $\mu\text{L}$  de DMSO con agitación de la placa para asegurar la completa solubilización. La cantidad de formazán

producido es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas. Por último, se mide la absorbancia en el espectrofotómetro SPECTROstar Nano a una longitud de onda de 550 nm (ver Figura 15). Los resultados se expresan como porcentaje de reducción de MTT (% de viabilidad celular) considerando la media de las absorbancias de los pocillos control (células no sometidas a ningún tratamiento) como el 100% de reducción de MTT. Se usa una solución de Tritón X-100 (Sigma-Aldrich) al 5% como control negativo, que genera un elevado porcentaje de mortalidad celular.



Figura 15. Esquema explicativo del procedimiento para el ensayo de MTT.

#### 2.4.1.2. Ensayo de actividad LDH (lactato deshidrogenasa)

Se ha determinado la actividad de la enzima LDH como un bioindicador de viabilidad celular ampliamente utilizado (Fotakis y Timbrell, 2006). Se trata de una enzima que presenta localización citoplasmática; así, la cuantificación de la enzima liberada al medio de cultivo es indicativa de la integridad de la membrana plasmática y, con ello, de la viabilidad celular relativa. Cataliza la reducción de piruvato a lactato usando NADH como cofactor y, por tanto, la tasa de disminución de la absorbancia de NADH (debida a la oxidación de NADH a NAD<sup>+</sup>) es directamente proporcional a la actividad de LDH (López y col., 2003).

El **procedimiento** para la determinación de la actividad enzimática LDH se basa en el método de Koh y Choi (1987), con ligeras modificaciones. Se siembran las células en placas de 24 pocillos (a una densidad de  $2 \times 10^5$  y  $3 \times 10^5$  de células SH-SY5Y y U373-MG, respectivamente) y se incuban durante 24 h. Tras ello, se tratan las células durante otras 24 h con cuatro

concentraciones en el rango de 5 a 100 µg/ml de los extractos metanólicos o metabolitos aislados. Se retira y almacena el sobrenadante (que contiene la LDH liberada al medio) y se añade a las células un tampón de fosfato de sodio 0,1 mM y pH 7,4 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Panreac) conteniendo un 0,5% de Tritón X-100, que favorecerá la muerte celular por necrosis, con disrupción de las membranas plasmáticas y liberación de toda la LDH restante. Tanto los sobrenadantes como los lisados celulares finales se centrifugan (3000 rpm, 5 min, 4°C) para eliminar los restos celulares. Se ponen 100 µl de cada una de las muestras en pocillos de una placa de 96, donde se añaden otros 100 µl de una mezcla reactiva compuesta por piruvato sódico 0,18 mM (Sigma-Aldrich) y NADH 0,60 mM (Sigma-Aldrich) en tampón fosfato (50 mM, pH 7,4). La tasa de conversión de NADH a  $\text{NAD}^+$  o actividad de la enzima se mide espectrofotométricamente a 340 nm cada minuto durante 10 min usando un FLUOstar OPTIMA. Los resultados se expresan como porcentaje de actividad LDH liberada respecto al total de la actividad enzimática celular.

#### **2.4.1.3. Estudios morfológicos**

Para el estudio de la morfología celular se utiliza un microscopio de contraste de fases (objetivos 10x y 40x). Las imágenes se capturan con una cámara digital Moticam 2500 (Motic, Hong Kong).

#### **2.4.2. Estudio de la actividad citoprotectora frente a estrés oxidativo**

El **ensayo de reducción de MTT** anteriormente descrito se utiliza inicialmente para determinar los efectos de los distintos tratamientos sobre la actividad enzimática mitocondrial y para seleccionar el rango de concentraciones en que los extractos y metabolitos liquénicos no tienen efecto significativo sobre la viabilidad celular. Posteriormente, esas concentraciones no citotóxicas serán empleadas para **evaluar la capacidad de las muestras liquénicas para ejercer citoprotección frente al estrés oxidativo inducido por  $\text{H}_2\text{O}_2$**  por el mismo procedimiento.

La inducción de estrés oxidativo se consigue por exposición de las células a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Así, a las 24 h de pre-tratamiento con las distintas muestras (y concentraciones), se tratan las células con  $\text{H}_2\text{O}_2$  en medio al 1% a las concentraciones de 0,1 mM y 1 mM para las células SH-SY5Y y U373-MG, respectivamente. La exposición a  $\text{H}_2\text{O}_2$  se hace durante 30 min y, 24 h después, se realiza el ensayo de MTT en las mismas condiciones experimentales descritas (apartado 2.4.1.1.).

### 2.4.3. Preparación de los extractos celulares

Los experimentos desarrollados en el presente trabajo de Tesis Doctoral requieren de la preparación de distintos tipos de extractos celulares a partir de las células SH-SY5Y y U373-MG en cultivo (en placas de Petri con confluencia del 80-90%) previamente sometidas al tratamiento correspondiente. Como paso previo a la preparación de extractos, se requiere levantar las células de la superficie de cultivo (“raspado” o “*scrapping*”) y centrifugarlas a 1500 rpm durante 5 min para eliminar el sobrenadante formado mayoritariamente por medio de cultivo y compuestos del tratamiento. Las células deben re-suspenderse entonces con PBS con el fin de lavar el pellet celular; se centrifugan de nuevo a las mismas condiciones y se elimina el sobrenadante con los restos del medio. Las células sin lisar se almacenan a -20°C para una correcta conservación hasta su uso.

#### 2.4.3.1. Extractos totales

Los extractos celulares totales se utilizan para la determinación de marcadores de estrés oxidativo, de actividad de caspasa-3 y de expresión de enzimas antioxidantes, así como para la cuantificación de proteínas.

Los extractos totales se preparan a partir de los pellets celulares obtenidos tras los tratamientos, los cuales se re-suspenden en una solución de tampón de lisis a pH 7,4 formada por EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, Tris 25 mM y 0,1% Tritón X-100, a la que se adicionan antiproteasas: 20 µl/ml de leupeptina (1 mg/ml), 35 µl/ml de PMSF (0,5 mg/ml) y 10 µl/ml de pepstatina (1 mg/ml). Se mantienen durante 20 min en hielo para que el tampón de lisis actúe, y luego se centrifugan (2500 rpm, 10 min, 4°C). El sobrenadante que resulta tras la centrifugación es el extracto celular total que se usa para los distintos experimentos, mientras que los detritus celulares se encuentran en el pellet precipitado, que se descarta.

#### 2.4.3.2. Extractos citosólicos y nucleares

Se utilizan para la determinación de la expresión del factor Nrf2 en el citoplasma y núcleo, respectivamente. Además, los extractos nucleares se emplean para analizar la capacidad de unión del factor Nrf2 al ADN (ensayo de ELISA, kit TransAM).

Ambos extractos se preparan secuencialmente partiendo también de los pellets celulares. Éstos se re-suspenden en un tampón de lisis especial que contiene: EDTA 1 mM,

EGTA 1 mM, KCl 10 mM, NaF 5 mM,  $\text{NaVO}_4$  1 mM,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  10 mM, DTT 1 mM, HEPES 10 mM (pH 7,9) y antiproteasas [PMSF 0,5 mM, leupeptina 10  $\mu\text{g/ml}$  y pepstatino 1  $\mu\text{g/ml}$ ]. Se mantienen durante 15 min en hielo para producir la lisis celular y, a continuación, se añade Nonidet P-40 al 10% (detergente que favorece la lisis de las membranas plasmáticas y el aislamiento de las proteínas citoplasmáticas, sin capacidad de lisar la membrana nuclear). Se centrifugan a 13000 rpm durante 30 segundos a 4°C, y se recogen los sobrenadantes que contienen los extractos citosólicos.

Para obtener los extractos nucleares, los pellets resultantes de la centrifugación anterior se re-suspenden en una solución de lisis que contiene EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NaCl 0,4 mM, NaF 5 mM,  $\text{NaVO}_4$  1 mM,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  10 mM, DTT 1 mM, HEPES 20 mM, 20% glicerol y antiproteasas [PMSF 0,5 mM, leupeptina 10  $\mu\text{g/ml}$  y pepstatino 1  $\mu\text{g/ml}$ ]. Las muestras se someten a agitación en frío (4°C) durante 30 min con la finalidad de romper las membranas nucleares. Por último, se centrifuga de nuevo (15000 rpm, 5 min, 4°C) y se recogen los sobrenadantes que corresponden a los extractos nucleares. Tanto los extractos citosólicos como nucleares se conservan a -80°C hasta su uso.

Todos los reactivos utilizados para la preparación de los distintos extractos celulares se obtienen de Sigma-Aldrich, con excepción de NaCl, las sales de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) y el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) que se adquieren de Panreac.

#### **2.4.4. Medida de la concentración de proteínas**

Para la determinación de los niveles de proteínas totales hemos utilizado el método del ácido bicinconínico (Smith y col., 1985; Walker, 1994), con ligeras modificaciones. Este método se basa en la capacidad que posee el ácido bicinconínico, cuando está en forma de sal sódica, para formar un complejo con los iones  $\text{Cu}^{1+}$  (producidos en la reacción entre proteínas e iones  $\text{Cu}^{2+}$  en medio alcalino: reacción de Biuret). El complejo toma un color púrpura cuya intensidad puede medirse a 562 nm y es directamente proporcional a la concentración de proteínas. Es una técnica modificada a partir del método de Lowry (Lowry y col., 1951).

El **procedimiento** consiste en adicionar 5  $\mu\text{l}$  (cantidad que puede modificarse) de los sobrenadantes de los extractos celulares de las distintas muestras en pocillos de placas de 96. Cada pocillo se completa hasta un volumen final de 225  $\mu\text{l}$  con 20  $\mu\text{l}$  de agua destilada y 200  $\mu\text{l}$  de una mezcla reactiva compuesta por un 98% de ácido bincinconínico (Sigma-Aldrich) y un 2% de sulfato de cobre (II) (Sigma-Aldrich). Posteriormente, la placa se incuba a 37°C durante 45

min y se mide la absorbancia a una longitud de onda de 562 nm en el lector de placas SPECTROStar Nano. La cuantificación de proteínas se realiza mediante la interpolación de los datos de la lectura espectrofotométrica en una curva patrón de BSA (partiendo de una solución stock de 1 mg/ml en agua destilada). Los resultados se expresarán como mg de proteína por ml de muestra.

#### 2.4.5. Evaluación de las capacidades antioxidante y neuroprotectora *in vitro*

##### 2.4.5.1. Pruebas químicas de captación de radicales libres

###### 2.4.5.1.1. ORAC

El ensayo ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) permite determinar la capacidad antioxidante de una muestra problema, basada en la captación de radicales peroxilo, especie pro-oxidante que puede generar daño oxidativo a nivel celular. Es un ensayo comúnmente utilizado para medir la actividad antioxidante de productos naturales (Yalcin y Sogut, 2014; Garzón y col., 2015). Su fundamento se basa en la medida de la pérdida de fluorescencia del compuesto fluoresceína en presencia de radicales peroxilo, que se generan como resultado de la descomposición térmica del azocompuesto AAPH [2,2'-azobis (2-amidinopropano)-dihidrocloruro] (Cao y col., 1993).

El **procedimiento** utilizado ha sido el descrito por Dávalos y col. (2004), con modificaciones. Las muestras (extractos metanólicos secos o compuestos aislados) se disuelven en metanol a la concentración de 1 mg/ml. A partir de esa solución stock, se preparan diluciones en PBS (75 mM y pH 7,4) y se añaden a una placa de 96 pocillos en concentraciones crecientes. En esos pocillos, se adiciona también el trolox (análogo hidrosoluble de la vitamina E), que se usa como antioxidante de referencia, y 120 µl de fluoresceína 70 nM, tras lo cual se atempera a 37°C durante 10 min. Por último, antes de iniciar la medición, se añade la solución de AAPH 12 mM (60 µl) que desencadena la generación de radicales libres. La fluorescencia se mide a 37°C durante 104 ciclos (56 segundos/ciclo) en el espectrofluorímetro de microplacas FLUOstar OPTIMA, empleando las siguientes longitudes de onda:  $\lambda_{exc} = 485$  nm y  $\lambda_{em} = 520$  nm.

La fluorescencia disminuye en presencia de radicales peroxilo, manteniéndose más estable en presencia de un compuesto antioxidante capaz de donar un átomo de hidrógeno y

captar los radicales peroxilo. Por tanto, la concentración de antioxidante en las muestras es directamente proporcional a la intensidad de la fluorescencia en cada pocillo (Ou y col., 2002). La variación de la fluorescencia con el tiempo se determina mediante el área bajo la curva (AUC):  $AUC = 1 + \sum f_i / f_0$

Donde  $f_i$  es la fluorescencia medida a un tiempo determinado y  $f_0$  es la fluorescencia inicial medida a tiempo 0. Por último, se determina el AUC total:

**AUC total = AUC antioxidante (trolox o muestra problema) - AUC del blanco (solo PBS)**

Tras calcularse las ecuaciones de las rectas de regresión correspondientes al área neta y la concentración de cada muestra en estudio, se utilizan sus pendientes para calcular el valor ORAC: **Valor ORAC ( $\mu\text{mol equivalentes trolox} / \text{mg muestra}$ ) = AUC muestra / AUC trolox**

#### 2.4.5.1.2. DPPH

Este ensayo permite evaluar la capacidad antioxidante de una muestra basándose en su capacidad de neutralizar el radical DPPH. El DPPH es un radical libre relativamente estable en solución y con coloración púrpura intensa, que vira a amarillo pálido en presencia de un compuesto capaz de donar electrones que estabilizan su molécula (Molyneux, 2004) (Figura 16). Por tanto, una menor absorbancia (menor intensidad de color púrpura) implica que hay menores niveles de radical DPPH, y se relaciona con una mayor actividad antioxidante de la muestra.

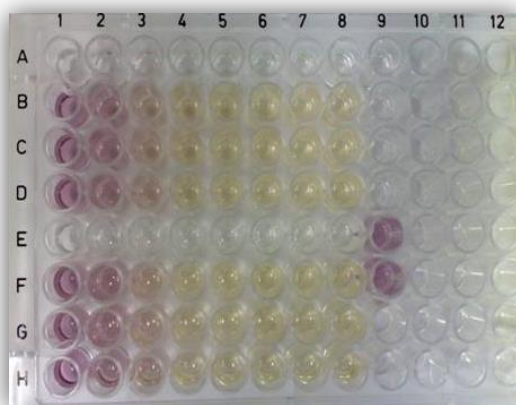


Figura 16. Ejemplo de una placa del ensayo DPPH. Se observan concentraciones crecientes de muestra antioxidante y desaparición progresiva del color púrpura característico del DPPH.

El ensayo de captación del radical DPPH se realizó de acuerdo al protocolo previamente descrito (Amarowicz y col., 2004). El **procedimiento** se desarrolla también en placas de 96 pocillos, en los cuales se adicionan diferentes concentraciones de las muestras problema (extractos metanólicos o metabolitos aislados), que se mezclan con una solución de DPPH en



metanol (2,2-difenil-1-picrilhidrazil, Sigma-Aldrich), de forma que la concentración de DPPH en pocillo es de 50  $\mu$ M. El volumen final en pocillo es de 225  $\mu$ l. La placa se incuba durante 30 min en oscuridad y a temperatura ambiente, y se realiza la lectura espectrofotométrica de la absorbancia a una longitud de onda de 517 nm. Se incluyen en la placa pocillos control (sólo DPPH), y se utiliza la absorbancia del metanol para corregir la absorbancia basal. El trolox se emplea como antioxidante estándar para comparar los resultados.

Los resultados se calculan mediante el porcentaje de inhibición del radical DPPH y se expresarán como concentración inhibitoria 50 o IC<sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml):

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Absorbancia muestra} \times 100}{\text{Absorbancia DPPH}}$$

## 2.4.5.2. Marcadores de estrés oxidativo

### 2.4.5.2.1. Generación intracelular de ERO

La determinación de la producción intracelular de especies reactivas de oxígeno (ERO) se ha realizado mediante el **ensayo de la 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA)**. La DCFH-DA es una molécula no fluorescente y neutra capaz de atravesar las membranas celulares. Dentro de la célula, por acción secuencial de esterasas celulares y la presencia de ERO, genera finalmente dicloro-fluoresceína (DCF) (Figura 17), cuya intensidad de fluorescencia será directamente proporcional a los niveles de ERO intracelulares, que es un marcador del nivel de estrés oxidativo (LeBel y col., 1992; Aranda y col., 2013).

El **procedimiento** se inicia con la siembra en placas de 96 pocillos de  $3 \times 10^4$  y  $5 \times 10^4$  células/pocillo de las líneas celulares SH-SY5Y y U373-MG, respectivamente. Se incuban las placas durante 24 h (confluencia celular en torno al 90%) y se tratan las células con los extractos y metabolitos liquénicos.

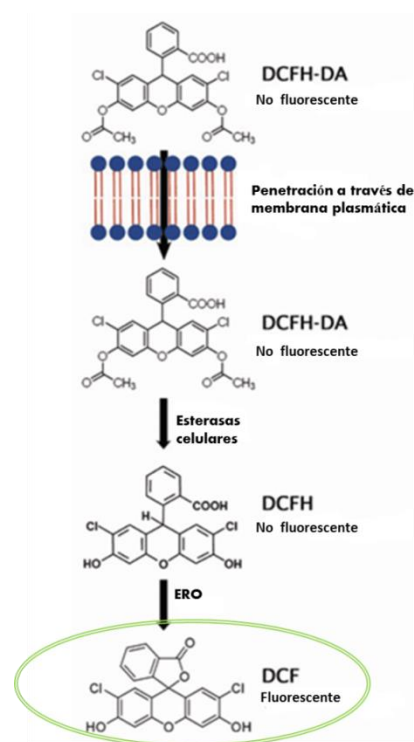


Figura 17. Fundamento del empleo de la DCFH-DA para la medida de la generación intracelular de ERO.

Tras los tratamientos, se añaden 200  $\mu$ l/pocillo de una solución de DCFH-DA 0,01 mM (Sigma-Aldrich) en PBS glucosado (18 mg glucosa/ml PBS estéril) y se incuba la placa durante 1 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Tras ello, se exponen las células a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 mM para SH-SY5Y y 1 mM para U373-MG) durante 30 min. Entonces, se lavan con 200  $\mu$ l/pocillo de PBS glucosado y se mide la fluorescencia durante 2 h (cada 10 min la primera hora y cada 15 min la segunda) a  $\lambda_{exc}$  = 480 nm y  $\lambda_{em}$  = 510 nm en el fluorímetro de microplacas FLx800. Entre medidas, las placas se mantienen a 37°C y en oscuridad. Los resultados se expresan en porcentaje de generación de ERO, tomando como 100% de generación de ERO la intensidad de la fluorescencia de las células control.

#### **2.4.5.2.2. Peroxidación lipídica**

La estimación de los niveles de peroxidación lipídica se ha realizado mediante la **cuantificación de la concentración de malondialdehído (MDA)** en las muestras de células, mediante  **cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)** (protocolo modificado de Grotto y col., 2007). El MDA es un producto secundario de la peroxidación lipídica que se utiliza como biomarcador fiable de este proceso, que se encuentra aumentado en varias enfermedades neurodegenerativas (Devbhuti y col., 2009; Bulut y col., 2013).

La **preparación de las muestras** (células SH-SY5Y y U373-MG sometidas a los diferentes tratamientos en estudio) se aborda a través del procedimiento definido en el anterior punto 2.4.3. (extractos totales). Se favorece la lisis celular con un paso de ligera sonicación de las muestras: dos ciclos de 10 segundos a una amplitud del 100%. A 200  $\mu$ l del sobrenadante (en el cual se miden proteínas por el método del ácido bicinconínico) se les adicionan 200  $\mu$ l de acetonitrilo para precipitar las proteínas. Las muestras se agitan posteriormente en vórtex y se centrifugan (10 min, 3000 rpm, 4°C). Por último, los sobrenadantes se filtran a través de filtros de nylon con un tamaño de poro de 0,22  $\mu$ m previo a su análisis por HPLC.

El cromatógrafo empleado ha sido un modelo Agilent 1200 Infinity, equipado con una columna analítica Eclipse plus C18 (150 mm  $\times$  4,6 mm, 5  $\mu$ m de tamaño de partícula, Agilent Technologies). Las condiciones establecidas para el análisis han sido las siguientes: fase móvil compuesta por agua mili Q y metanol (50:50), elución isocrática, flujo 0,5 ml/min, volumen de muestra inyectado de 20  $\mu$ l, temperatura de 40°C, tiempo de análisis 10 min y longitud de onda de detección 268 nm.

Se realizó una curva de calibrado de MDA patrón a partir de una solución madre de MDA (Merck, Alemania) de 3 mM, preparando diversas diluciones en un rango de concentraciones de 1 a 20  $\mu$ M. El tiempo de retención del MDA es de 3,2 min (Figura 18). Los resultados se presentan como nmol MDA/mg proteína. La curva patrón utilizada ha sido:

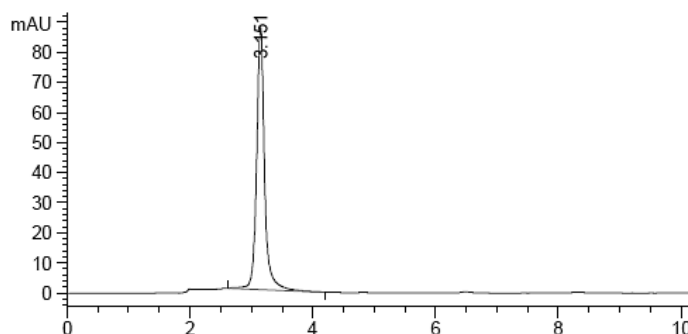
$$Y = 101,22 X + 18,03 \quad (R^2 = 0,9992).$$


Figura 18. Cromatograma representativo de una muestra de MDA patrón (5  $\mu$ M).

#### 2.4.5.2.3. Sistema glutatión

Los niveles del tripéptido glutatión se han determinado tanto en su estado reducido (GSH) como oxidado (GSSG), por ser el principal sistema antioxidante no enzimático del organismo. Para la cuantificación del glutatión en las muestras de células derivadas de SNC (líneas SH-SY5Y y U373-MG) se utiliza el método inicialmente descrito por Hissin y Hilf (1976), con modificaciones. Este método se basa en la capacidad del GSH para reaccionar con el fluoróforo o-ftaldehído (OPT) a pH 8 con generación de un compuesto (isoindol) cuya fluorescencia puede cuantificarse por su máximo de emisión a 420 nm. El GSSG reacciona de manera similar pero a pH 12. La fluorescencia será tanto más intensa cuanto mayor sea la concentración de GSH y GSSG, respectivamente.

En la **preparación de las muestras** debe considerarse la relevancia del pH en este ensayo. Los pellets celulares provenientes de los distintos tratamientos se homogeneizan en 300  $\mu$ l de un tampón fosfato que contiene  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M y EDTA 5 mM (pH 8,0). La lisis de las células se favorece mediante sonicación (10 segundos, en hielo). Posteriormente, se centrifugan las muestras (2500 rpm, 10 min, 4°C) y se utiliza el sobrenadante (extracto total) tanto para la medida de proteínas en las mismas (según protocolo en apartado 2.4.4.) como para cuantificar el GSH y el GSSG. Previamente a medir los niveles de glutatión, se precipitan las proteínas empleando ácido perclórico 1% (1,5  $\mu$ l/ml) y posterior centrifugación (14000 rpm, 10 min, 4°C). Las muestras deben mantenerse en frío durante todo el ensayo.

Para la **determinación del glutatión reducido (GSH)** se añaden en placas de 96 pocillos: 50 µl del sobrenadante obtenido anteriormente para cada muestra, 150 µl de tampón fosfato-EDTA (pH 8) y 20 µl de OPT (solución 1 mg/ml en metanol). Esas mezclas se incuban durante 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, la fluorescencia se mide a  $\lambda_{exc} = 350$  nm y  $\lambda_{em} = 420$  nm en el fluorímetro de microplacas FLx800.

El **glutatión oxidado (GSSG)** se determina por un procedimiento similar con alguna modificación. Se adicionan 50 µl/pocillo del sobrenadante (extractos totales) de cada muestra, y 3 µl de N-etilmaleimida (NEM) 7,5 M. Se incuba durante 5 min a temperatura ambiente y protegido de la luz para que el NEM bloquee la forma reducida del glutatión, de manera que ésta no pueda reaccionar con OPT y se cuantifique únicamente la fluorescencia debida a GSSG. Posteriormente, se añaden 150 µl de tampón NaOH 0,1 N (pH 12) y 20 µl de OPT. La placa se incuba durante 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad y se mide la intensidad de fluorescencia en las mismas condiciones que para el GSH.

La cuantificación de los niveles de GSH y GSSG requiere de la preparación de dos curvas patrones con concentraciones conocidas de ambos compuestos: 0-180 ng de GSH en tampón fosfato pH 8, y de GSSG en tampón NaOH pH 12. Los resultados obtenidos de interpolar la fluorescencia de nuestras muestras en las curvas patrones se expresan como nmol GSH o GSSG por mg de proteína. Los resultados finales se expresan como **ratio GSH/GSSG**, que se utiliza como un índice redox para estimar el nivel de estrés oxidativo tisular (Asensi y col., 1999; Chakravarthi y col., 2006).

Todos los reactivos utilizados en este experimento se adquirieron de Sigma-Aldrich, con excepción del ácido perclórico y el hidróxido sódico que se obtuvieron de Panreac.

#### **2.4.5.3. Expresión de proteínas por técnica de inmunoblot (*Western Blot*)**

La técnica de inmunohistoquímica Western Blot permite detectar proteínas específicas en una muestra biológica. Es una técnica semicuantitativa ampliamente utilizada que se basa en una separación de las proteínas en función de su peso molecular mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida. La posterior transferencia de esas proteínas a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) facilita su detección mediante quimioluminiscencia, tras incubación con anticuerpos específicos de cada proteína. La calidad de los resultados y reproducibilidad del método depende en gran medida del tipo y pureza del anticuerpo usado (Kurien y col., 2011).

Se ha utilizado la técnica de Western Blot para la **determinación del nivel de expresión de enzimas antioxidantes** (catalasa, superóxido dismutasas 1 y 2, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa y hemoxigenasa-1) en las líneas celulares modelos de neurona (SH-SY5Y) y astrocito (U373-MG); todas esas proteínas se determinarán en extractos celulares totales. También por Western Blot se va a **cuantificar el nivel de expresión del factor Nrf2**, tanto en extractos citoplasmáticos como nucleares.

El **procedimiento** secuencial de la técnica de Western Blot se resume a continuación:

- Una vez preparados los extractos celulares y medida la concentración de proteínas, se toma el volumen que contenga 20 µg de proteína y se mezcla hasta 25 µl con tampón de lisis y 5 µl de tampón de muestra 5x (ver composición en la Tabla 10). Las muestras se hierven durante 4 min a 100°C para desnaturalizar las proteínas y que puedan separarse en los geles.
- Se cargan las muestras en los geles (10-15% de acrilamida según la proteína a medir) y se pone en marcha la electroforesis a voltaje constante de 100 v (gel concentrador) y 200 v (gel separador). Durante este proceso, las proteínas se separan en función de su peso molecular.
- Una vez finalizada la electroforesis, se procede a la transferencia de las proteínas desde el gel de poliacrilamida a una membrana de PVDF en tampón de transferencia mediante una corriente continua de 350 mA durante 60 min, y en frío (cubeta con hielo).
- Después de la transferencia, la membrana se bloquea con una solución de leche en polvo al 10% en PBS durante 90 min, de forma que se busca evitar la fijación inespecífica de los anticuerpos a otras zonas de la membrana que no sean las bandas proteicas de interés.
- Tras el bloqueo, se lavan bien las membranas con PBS y se incuban con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C (nevera) y en agitación. A las 24 h, se lavan de nuevo las membranas con PBS-Tween (durante 30 min y cambiando la solución de lavado cada 5 min) y se incuban nuevamente con el correspondiente anticuerpo secundario (anti-ratón o anti-conejo), durante 2 h y a temperatura ambiente.
- Finalmente, se lavan las membranas de nuevo con PBS-Tween y se hará la lectura de quimioluminiscencia. Para ello, se utiliza el kit de detección ECL Prime (GE Healthcare, Reino Unido) y el lector de quimioluminiscencia Image Quant LAS 500. La cuantificación de las bandas de proteínas se realiza por un análisis densitométrico usando el programa Image Quant. Los resultados de expresión proteica se expresan como porcentajes relativos, considerando la expresión de una determinada proteína en las células control como el 100% de expresión.

- Medida de la  $\beta$ -actina. Se realiza un paso de *stripping* o eliminación de los anticuerpos previamente fijados a la membrana. Se lava la membrana con PBS-Tween y ácido acético al 5% varias veces durante 45 min. A continuación, se bloquea de nuevo con leche en polvo en disolución y se procede a la incubación con anticuerpo 1º de  $\beta$ -actina tal y como se ha especificado anteriormente.

Reactivo	Composición
Tampón de lisis	Tris 25 mM, NaCl 150 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 M (Sigma-Aldrich) y Tritón X-100 0,1%
Tampón de muestra 5x	Tris-HCl 60 mM (pH 6,8), glicerol 25%, dodecil sulfato sódico (SDS) 2%, mercaptoetanol 14,4 mM y azul de bromofenol 0,1%
Gel separador	Solución A (30% acrilamida y 0,8% bisacrilamida), Solución B (Tris-HCl 2 M pH 8 y SDS 10%), persulfato amónico 10% y 10 $\mu$ l N,N,N',N'-tetrametil-etileno-diamina (TEMED)
Gel concentrador	Solución A (30% acrilamida y 0,8% bisacrilamida), Solución C (Tris-HCl 1 M pH 6,8 y SDS 10%), persulfato amónico 10% y 10 $\mu$ l TEMED
Tampón de electroforesis	Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1% (pH 8,3)
Tampón de transferencia	Tris 15,6 mM, glicina 120 mM y metanol 20% (pH 8,1-8,4)
Solución de bloqueo	Leche en polvo desnatada al 10% disuelta en PBS

Tabla 10. Composición de los reactivos utilizados en la técnica de Western Blot.

Los **anticuerpos primarios** utilizados, y sus respectivas diluciones de trabajo, han sido los siguientes:

- Anti SOD-1 (sc-11407): 1:1000
- Anti SOD-2 (sc-30080): 1:1000
- Anti CAT (sc-50508): 1:10000
- Anti GR (sc-32886): 1:1000
- Anti GPx (sc-30147): 1:1000
- Anti HO-1 (sc-10789): 1:1000
- Anti Nrf2 (sc-722): 1:500
- Anti  $\beta$ -actina (A2228): 1:50000
- Anti TFIIIB (sc-271784): 1:500

Los **anticuerpos secundarios** conjugados a peroxidasa que se han empleado para esta técnica han sido:

- Anti-IgG de ratón (A9044): 1:3000
- Anti-IgG de conejo (sc-2004): 1:3000

Como controles de carga proteica, se han utilizado la  $\beta$ -actina para extractos totales y citosólicos, y la proteína de unión a TATA (TFIIIB) para extractos nucleares.

#### 2.4.5.4. Marcadores de disfunción mitocondrial y apoptosis

##### 2.4.5.4.1. Potencial de membrana mitocondrial

Un adecuado potencial de membrana mitocondrial (PMM) es esencial para el correcto funcionamiento de la mitocondria y del metabolismo energético celular. Es, además, uno de los primeros parámetros que se ve afectado por el estrés oxidativo (Onyango y Khan, 2006; Detmer y Chan, 2007). Se utilizan diversos compuestos catiónicos para determinar el PMM, de entre los cuales, se ha empleado el éster metílico de tetrametilrodamina (TMRM) en el presente trabajo. El TMRM es un fluorocromo lipófilo selectivo de mitocondrias que, por su carácter catiónico, accede al interior mitocondrial cargado negativamente (en aquellas mitocondrias funcionalmente activas) (Scaduto y Grotyohann, 1999).

El **procedimiento** se inicia con la siembra de células SH-SY5Y y U373-MG en placas de 24 pocillos ( $2 \times 10^5$  y  $3 \times 10^5$  células/pocillo, respectivamente). Se hacen los correspondientes tratamientos con los compuestos en estudio a las dosis óptimas durante 24 h, y posterior exposición a  $H_2O_2$  durante 30 min. Tras ello, se elimina el medio con el tratamiento y se añade una disolución de TMRM 150 mM (Biotium Inc., CA, EEUU) en medio de Krebs (formado por: NaCl 132 mM, KCl 4 mM,  $MgCl_2$  1,4 mM, glucosa 6 mM, HEPES 10 mM,  $CaCl_2$  1 mM; pH 7,4), midiéndose la fluorescencia durante 45 min a  $\lambda_{exc} = 549$  nm y  $\lambda_{em} = 573$  nm usando el fluorímetro FLUOstar OPTIMA, estabilizado a 37°C. Seguidamente, se adiciona FCCP (6  $\mu$ M) y oligomicina (0,25  $\mu$ g/ml) (Tocris, Reino Unido) y se mide la fluorescencia durante 15 min en las mismas condiciones descritas (Correia y col., 2012). La oligomicina genera inicialmente una hiperpolarización de las mitocondrias con aumento de fluorescencia de TMRM (debida a la inhibición de la unidad  $F_0$  de la ATPasa), mientras que el FCCP (carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona) desacopla la fosforilación oxidativa que resulta en despolarización mitocondrial y caída de la fluorescencia.

El PMM se determina calculando la diferencia entre la fluorescencia final, obtenida tras la adición de la oligomicina y FCCP, y la fluorescencia inicial (resultante del TMRM captado por las mitocondrias tras los tratamientos). Los resultados se van a expresar en porcentaje de PMM relativo a control, considerando como 100% el valor de fluorescencia basal en células no tratadas.

#### 2.4.5.4.2. Niveles de calcio mitocondrial

Se determina la capacidad de la mitocondria para la captación de calcio hacia el interior del orgánulo mediante un método basado en la utilización de la sonda fluorescente Rhod-2/AM (Takahashi y col., 1999). Ésta es una molécula lipófila y catiónica que se distribuye selectivamente hacia el interior mitocondrial, donde su forma éster se hidroliza y queda retenida, siendo capaz de emitir fluorescencia cuando se une a los iones  $\text{Ca}^{2+}$ . La intensidad de la fluorescencia será tanto mayor cuanto más elevada esté la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria, y permite cuantificarlo (Smets y col., 2004). La ruptura de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  entre los distintos compartimentos celulares puede acarrear graves problemas a nivel de la funcionalidad mitocondrial, ya que provoca el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (Giorgi y col., 2012).

Tras los tratamientos de células SH-SY5Y y U373-MG sembradas en placas de 24 pocillos, éstas se lavan dos veces con medio de Krebs con calcio y sin sonda fluorescente, con el fin de eliminar los restos de medio de cultivo y tratamientos. A continuación, se incuban a 37°C durante 40 min con medio de Krebs con calcio y sonda fluorescente, para que las células capten el Rhod-2/AM (10  $\mu\text{M}$  en pocillo; Thermo Fisher). Después, se lavan las células dos veces con medio de Krebs sin calcio y sin sonda para eliminar los restos de sonda fluorescente, y se incuban las placas durante 30 min a 37°C, con el objetivo de que la forma éster de la sonda fluorescente acceda a la mitocondria y se hidrolice, reaccionando con los iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Tras la incubación, se mide la fluorescencia durante 5 min a  $\lambda_{\text{exc}} = 552 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{em}} = 581 \text{ nm}$ , y a 37°C, en el fluorímetro FLUOstar OPTIMA. Por último, se adiciona el ionóforo A23187 (5  $\mu\text{M}$ ; Trocris), y se vuelve a medir la fluorescencia durante 15 min en las condiciones indicadas anteriormente. La adición de este ionóforo permite incrementar los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico libre, pues libera iones calcio de otros compartimentos celulares como el retículo endoplasmático (Deniaud y col., 2008; Lemasters y col., 2009).

Se calculará el ratio entre la fluorescencia máxima con la adición del ionóforo A23187 y la fluorescencia basal, que será mayor o menor según los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial tras los tratamientos celulares. Los resultados se van a expresar como la capacidad de captación de  $\text{Ca}^{2+}$  por la mitocondria en porcentajes relativos, considerando como el 100% la capacidad de captación de  $\text{Ca}^{2+}$  de las mitocondrias de células control.



#### 2.4.5.4.3. Niveles de calcio citosólico

La determinación de los niveles de calcio en citoplasma es clave para estimar el mantenimiento o disrupción de la homeostasis de este ión, pues están íntimamente relacionados con la funcionalidad mitocondrial; cuando están anormalmente elevados afectan a la respiración mitocondrial (Robb-Gaspers y col., 1998). La cuantificación del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico se ha abordado mediante la utilización de la sonda fluorescente Indo-1/AM en su forma de éster (Bush y Jones, 1987). Se trata de otro fluoróforo que, al hidrolizarse por esterasas intracelulares, reacciona con iones  $\text{Ca}^{2+}$  citosólicos, generando un complejo fluorescente.

El **procedimiento** para medir la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico consiste en incubar las células SH-SY5Y y U373-MG (en placas de 24 pocillos y sometidas previamente a los tratamientos en estudio) con la sonda fluorescente Indo-1/AM ( $3 \mu\text{M}$  en pocillo; Life Technologies) disuelta en medio de Krebs durante 45 min y  $37^\circ\text{C}$ , en oscuridad. Seguidamente, se retira el medio con la sonda y se incuban con medio de Krebs (sin sonda fluorescente) durante 15 min en las condiciones fijadas, para favorecer la hidrólisis del éster. Se mide entonces la fluorescencia durante 4 min a  $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{em}} = 410 \text{ nm}$ , y a  $37^\circ\text{C}$ , en el FLUOstar OPTIMA. Después de esta medida, se añade ionomicina ( $3 \mu\text{M}$  en pocillo; Tocris) y se mide la fluorescencia durante 8 min bajo las mismas condiciones de la medida anterior. Finalmente, se adiciona  $\text{MnCl}_2$  ( $3 \text{ mM}$  en pocillo; Sigma-Aldrich) y se vuelve a medir la fluorescencia durante 4 min. La ionomicina aumenta los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el citoplasma y dará lugar a la señal máxima de fluorescencia (Müller y col., 2013), mientras que con el  $\text{MnCl}_2$  se puede valorar la señal de fluorescencia mínima (o autofluorescencia), ya que permite captar el exceso de Indo-1 que ha fugado del interior celular.

La concentración de calcio citosólico o intracelular se calcula mediante la fórmula:

$$[\text{Ca}^{2+}]_c = K_d \times (F - F_{\min}) / (F_{\max} - F)$$

Donde tenemos que  $K_d$  es la constante de disociación del complejo Indo-1- $\text{Ca}^{2+}$  ( $250 \text{ nM}$ );  $F$  es señal de fluorescencia relativa de la muestra;  $F_{\max}$  es la señal de fluorescencia máxima tras la adición de ionomicina; y  $F_{\min} = AF + 1/12(F_{\max} - AF)$ , siendo  $AF$  la señal de auto-fluorescencia obtenida después de la adición de  $\text{MnCl}_2$ .

#### 2.4.5.4.4. Actividad de la enzima caspasa-3

Se ha determinado la actividad enzimática caspasa-3 como un indicador del grado de activación de la apoptosis celular. La caspasa-3 es una cisteína-proteasa que actúa como enzima efectora en las fases finales de la apoptosis (tanto por vía intrínseca como extrínseca), con especial relevancia en células del SNC (D'Amelio y col., 2010). Su actividad se mide por un ensayo de fluorimetría con utilización del sustrato sintético Ac-DEVD-AMC [N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-AMC (7-amino-4-metilcumarina)]. Cuando este sustrato se hidroliza por la enzima se libera el AMC, que es un producto fluorescente (Hitomi y col., 2004). Por tanto, puede relacionarse la intensidad de la fluorescencia con la actividad de la enzima.

El **procedimiento** se inicia con el pre-tratamiento de las células SH-SY5Y y U373-MG en placas de 24 pocillos ( $2 \times 10^5$  y  $3 \times 10^5$  células/pocillo, respectivamente) y posterior inducción de estrés oxidativo por exposición a  $H_2O_2$  (30 min). Para el ensayo de actividad enzimática, se lisan las células con un tampón de lisis compuesto por Tris-HCl 10 mM,  $NaH_2PO_4/Na_2HPO_4$  10 mM (pH 7,4), NaCl 130 mM, Tritón X-100 0,5%,  $Na_4P_2O_7$  10 mM y DTT 2mM. Se levantan y recogen las células y, una vez lisadas, se centrifugan (13000 rpm, 5 min) y se conservan los sobrenadantes, donde se medirá la actividad de la caspasa-3. Una vez medidas las proteínas en los sobrenadantes, se toma el volumen necesario que contenga 20  $\mu$ g de proteína y se incuban (37°C, de 1 a 24 h) con tampón de ensayo específico para caspasa-3: HEPES 20 mM (pH 7,4), DTT 2 mM y sustrato Ac-DEVD-AMC 20 mM (disuelto inicialmente en DMSO y conservado a -20°C). La cinética de liberación del fluorocromo AMC se mide cada hora a  $\lambda_{exc} = 360/40$  nm y  $\lambda_{em} = 460/20$  nm en el fluorímetro de placas FLx800. La actividad enzimática se obtiene como unidades arbitrarias de fluorescencia por hora y por mg de proteína (UAF/h/mg proteína), y los resultados se expresarán finalmente como porcentajes relativos a control (considerando como el 100% el nivel de actividad basal de la enzima caspasa-3 en células control).

#### 2.4.5.4.5. Marcadores proteicos de apoptosis

Se ha utilizado la técnica inmunohistoquímica de **Western Blot** (técnica descrita en el punto 2.4.5.3. de la presente sección Material y Métodos) para la determinación de la expresión proteica de determinados marcadores de la apoptosis, tales como caspasa-3 activa, BAX y Bcl-2. Los niveles de estas proteínas se han determinado en extractos totales. Para ello, se han utilizado los siguientes anticuerpos primarios:

- Anti-caspasa-3 activa (A2156; NeoBiolab, Reino Unido): 1:2000.

- Anti-Bcl-2 (A0208; NeoBiolab, Reino Unido): 1:5000.
- Anti-BAX (A0207; NeoBiolab, Reino Unido): 1:5000.

Las proteínas BAX y Bcl-2 pertenecen a una gran familia de proteínas que ejercen un papel clave en la regulación de la apoptosis, a la vez que están íntimamente ligadas a la disfunción mitocondrial. La proteína BAX es pro-apoptótica, mientras que la proteína Bcl-2 actúa como un factor anti-apoptótico (Lei y col., 2002; Rolland y Conradt, 2010). La relevancia de la enzima caspasa-3 en el proceso de apoptosis se ha destacado en el apartado anterior de determinación de su actividad enzimática.

#### **2.4.5.5. Activación de la vía Nrf2**

Existen evidencias sólidas que apoyan la implicación de la vía de señalización intracelular Nrf2-ARE en la citoprotección frente a estrés oxidativo y su especial interés como posible mecanismo de neuroprotección (Joshi y Johnson, 2012). Se han determinado los **niveles de expresión proteica del factor de transcripción Nrf2** tanto en el compartimento **citosólico** como **nuclear**, mediante la técnica de **Western Blot**. De esta forma, puede determinarse el efecto de los tratamientos con los compuestos liquénicos sobre una mayor o menor translocación del factor Nrf2 hacia el núcleo, como requisito inicial para la activación de la transcripción de genes.

Además, se ha determinado la capacidad del factor Nrf2 para unirse al ADN y el efecto sobre ella de los metabolitos secundarios liquénicos, mediante la utilización del **Kit TransAM® Nrf2** (Active Motif, CA, EEUU). Para ello, se preparan inicialmente los extractos nucleares de las células SH-SY5Y y U373-MG. El fundamento de esta prueba se basa en un método de ELISA (“ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas”). El ensayo se realiza en placas de 96 pocillos en las cuales se ha inmovilizado un oligonucleótido que presenta la secuencia consenso del sitio específico de unión a ARE (5'-GTCACAGTGACTCAGCAGAATCTG-3'), y a la que se unirá selectivamente el Nrf2 activo presente en el extracto nuclear. Tras ello, se incuban con un anticuerpo primario que reconoce un epítipo de la proteína del factor Nrf2 unido al ADN. La posterior adición e incubación con un anticuerpo secundario conjugado con HRP proporciona una señal colorimétrica muy sensible y que puede ser cuantificada por espectrofotometría: en el último paso se mide la densidad óptica a 450 nm. Este ensayo proporciona una mayor especificidad y sensibilidad que las técnicas de retardo en gel para la detección de la activación

del factor Nrf2. Los resultados se expresan en porcentaje relativo a control, considerando la activación de la vía Nrf2 basal en células control como el 100%.

#### 2.4.5.6. Estudio del flujo autofágico

Como inicio al estudio del efecto de los metabolitos liquénicos (atranorina, ácido evérnico, ácido fumarprotocetrárico y ácido úsnico) sobre el mecanismo de autofagia, se han determinado los **niveles de expresión de las proteínas LC3-I y LC3-II**. La proteína de cadena ligera-3 asociada a microtúbulos (LC3) es una proteína soluble de aprox. 17 KDa presente en los tejidos de mamíferos, que se presenta mayoritariamente en la forma citosólica libre LC3-I. Cuando la autofagia se inicia, esta proteína se conjuga con un residuo de fosfatidiletanolamina para generar la forma LC3-II que se asocia a las membranas de los autofagosomas. En un proceso activo de autofagia, los autofagosomas se fusionarán con lisosomas para favorecer la degradación de las proteínas y orgánulos anómalos; también se degradará en ese momento la LC3-II (Tanida y col., 2008).

Se ha utilizado la técnica de **Western Blot** (descrita en el punto 2.4.5.3, sección Material y Métodos) (Klionsky y col., 2012) con el anticuerpo primario anti-LC3B (L7543, Sigma-Aldrich) a la dilución 1:2000, y la  $\beta$ -actina como control de carga de los extractos celulares totales de células SH-SY5Y.

Algunas **modificaciones** introducidas en la técnica de Western Blot para la determinación de estas proteínas han sido:

- Tratamiento de las células durante 6 h o durante 24 h con los metabolitos liquénicos, y con exposición o no a  $H_2O_2$ . Además, se han evaluado en presencia o ausencia de un inhibidor del flujo autofágico durante 2 h al final del tratamiento ( $NH_4Cl$  10 mM + leupeptina 100  $\mu M$ ).
- Sobre las placas Petri con las células (sometidas a los distintos tratamientos), se adiciona un tampón de lisis compuesto por Tris-Hcl 50 mM (pH 6,8), glicerol 10%, SDS 2%, ortovanadato 100 nM, NaF 1M, pirofosfato sódico 250 nM e inhibidor de proteasas 100X.
- El homogeneizado de las células se hierve a 95°C durante 15 min, inmediatamente después de preparar el extracto, para evitar la degradación de LC3. Tras medir proteínas, los extractos se pueden almacenar a -20/-80°C hasta su uso.
- Geles con un porcentaje de acrilamida del 17%.

## 2.4.6. Evaluación del potencial anticancerígeno

### 2.4.6.1. Citotoxicidad frente a células cancerígenas

El potencial anticancerígeno de los extractos metanólicos y los metabolitos liquénicos se ha determinado mediante la utilización de dos modelos *in vitro* de células cancerígenas ampliamente utilizados para estudios de citotoxicidad: las líneas celulares HepG2 y MCF-7 (Yarim y col., 2012). Se ha evaluado la capacidad de los extractos y compuestos en estudio para ejercer citotoxicidad y afectar a la viabilidad celular, mediante la **técnica de reducción del MTT**.

Las células HepG2 y MCF-7 se siembran a densidad de  $2-3 \times 10^4$  células/pocillo en placas de 96 y, tras alcanzar confluencia del 80-90%, se tratan durante 24 h con un amplio rango de concentraciones (0,5 - 250  $\mu\text{g/ml}$ ). Se procede según la técnica del ensayo de reducción de MTT (descrita anteriormente en el punto 2.4.1.). Los resultados se expresan como porcentaje de viabilidad celular relativo a control (100% de viabilidad celular).

## 2.5. Estudios de paso a través de BHE

### 2.5.1. Propiedades moleculares de los compuestos

Se han estimado ciertos descriptores moleculares de los compuestos liquénicos objeto de estudio, relacionados con sus propiedades físico-químicas. Con el fin de hacer una predicción *in silico* de su paso a través de BHE, se han utilizado distintos modelos computacionales.

- **Log P y peso molecular.** El coeficiente de reparto n-octanol/agua (log P) permite estimar la lipofilia de los compuestos considerando sólo las formas neutras de éstos. Se estima el log P utilizando el modelo computacional ALOGPS 2.1 (<http://www.vcclab.org>) que, con una base de datos de más de 10000 moléculas y sus log P experimentales (Physprop), predice la lipofilia de las moléculas en base a sus características electrónicas y topológicas (Tetko y col., 2005). Este programa también permite calcular el peso molecular de los compuestos, con la transformación previa de sus estructuras químicas a la notación SMILES (Sistema Lineal Simplificado para Entrada Molecular).
- **Área topológica de la superficie polar (TPSA).** Se define como la suma de las contribuciones superficiales de los átomos polares de una determinada molécula,

especialmente átomos de nitrógeno y oxígeno, así como los de hidrógeno unidos a ellos. Se determina usando el programa Daylight Chemical (<http://www.daylight.com>) con la notación SMILES de nuestros compuestos liquénicos (Ertl y col., 2000).

- **Número de grupos aceptores y donadores de enlaces de hidrógeno.** Para su cálculo se ha utilizado el software Molinspiration (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>).

### 2.5.2. Cinética de captación (“*uptake*”)

Los estudios de cinética de captación permiten evaluar si los compuestos en estudio son capaces de penetrar en las células endoteliales, pues esta capacidad sería fundamental en el proceso de atravesar los capilares cerebrales hacia el SNC. Para desarrollar esta técnica, utilizamos la **línea celular RBE4**, derivada del endotelio capilar de la microculación cerebral de rata.

En primer lugar, se analiza si las concentraciones de los compuestos en estudio afectan, en tratamientos de 24 h (tiempo máximo a que se va a analizar la captación), a la viabilidad celular de las células RBE4. Se utiliza la **técnica de reducción MTT**, tal y como se describe en el punto 2.4.1. Se siembran  $2-3 \times 10^4$  células/pocillo en placa de 96 y se analizan las concentraciones de 5 µg/ml, pues es la máxima concentración que se van a ensayar en estudios de *uptake*. Podemos considerar que si las concentraciones más elevadas no disminuyen la viabilidad celular al tiempo máximo de incubación (24 h), concentraciones más bajas tampoco ejercerán efectos citotóxicos a ése u otros tiempos menores.

El **procedimiento** para determinar la capacidad de *uptake* se inicia con la siembra de las células RBE4 ( $2-3 \times 10^4$  células/pocillo) en placa de 96 pocillos y, tras 24 h de crecimiento, se incuban con 200 µl de los metabolitos liquénicos a distintas concentraciones (1, 2,5 y 5 µg/ml) y durante distintos tiempos (30 min, 6 h, 18 h y 24 h). Tras las incubaciones, se retira el medio y las células se lavan con PBS estéril frío (3 veces), para eliminar los restos de compuestos. Seguidamente, las células se incuban 1 h (37°C) con 200 µl de una solución de lisis (Tritón X-100 al 1 %) que provocará la lisis celular con el objetivo de liberar la cantidad de compuesto que ha sido captado por las células endoteliales. Se levantan las células del pocillo (raspado o “*scrapping*”) para asegurar su lisis completa, se centrifuga ligeramente (1500 rpm, 2 min) y, a partir del sobrenadante, se miden proteínas y se realiza el análisis por HPLC (previa filtración por filtros de 0,22 µm de tamaño de poro).

El método de HPLC para la cuantificación del contenido intracelular de metabolitos liquénicos es el que se ha descrito previamente (apartado 2.1. de Material y Métodos). Se preparan, además, cuatro curvas de calibrado con cinco puntos correspondientes a concentraciones crecientes (en el rango de 0,0025 a 1  $\mu\text{g/ml}$ ) de cada uno de los metabolitos secundarios analizados: atranorina, ácido evérnico, ácido fumarprotocetrárico y ácido úsnico. Los resultados se expresan como ng de compuesto/mg de proteína.

### 2.5.3. Estudios de permeabilidad: modelo de BHE

Para los ensayos de permeabilidad se utiliza la **línea celular hCMEC/D3**, que deriva de células de endotelio vascular de capilares cerebrales humanos y presenta unas características muy adecuadas para su uso como modelo *in vitro* de BHE: establecimiento de uniones estrechas intercelulares y altos valores de resistencia transendotelial (Weksler y col., 2013). Previamente al ensayo, se analiza si los tratamientos que se van a investigar afectan a la viabilidad celular de las células hCMEC/D3 (mediante la técnica de MTT).

El **procedimiento** para los estudios de permeabilidad se resume a continuación:

- Se siembran  $2 \times 10^4$  células/ $\text{cm}^2$  en placas de 12 pocillos con membranas Transwell PET (Corning, NY, EEUU) de policarbonato, con un tamaño de poro de 0,4  $\mu\text{m}$ . Se añade medio de cultivo fresco cada 24 h para favorecer su la formación de una monocapa de células endoteliales. El volumen de medio del compartimento apical (mimetiza la luz del vaso cerebral) será de 300  $\mu\text{l}$  y el del compartimento basal (mimetiza el compartimento cerebral) será de 1000  $\mu\text{l}$ .
- Para asegurar la integridad del modelo celular, se mide la **TEER** (resistencia eléctrica transendotelial). La TEER es una característica fundamental de las células endoteliales y refleja el grado de permeabilidad a compuestos que ofrecen las uniones estrechas establecidas entre las células del modelo de BHE; la permeabilidad es inversamente proporcional a los valores de TEER. Ésta se evalúa diariamente mediante el uso del voltímetro epitelial EVOM2 conectado a un electrodo STX2 (World Precision Instruments, FL, EEUU). Los valores TEER se calculan restando la resistencia de los filtros (blanco) a la resistencia de las células; los valores de resistencia de la monocapa obtenidos se multiplican por la superficie del inserto ( $0,332 \text{ cm}^2$ ), de manera que los resultados de TEER se expresan como  $\Omega \times \text{cm}^2$ . Se encuentra que la TEER aumenta gradualmente durante el desarrollo del cultivo celular, desde valores bajos de 9-10  $\Omega \times \text{cm}^2$  (día 2 tras la siembra) hasta valores cercanos a 50  $\Omega \times \text{cm}^2$  tras 12-14 días de cultivo. En ese momento, puede hacerse ya el tratamiento con los compuestos (Markoutsy y col., 2011).

De forma similar, se confirma la integridad de la monocapa analizando el transporte del compartimento apical a basal del Lucifer Yellow (LY); éste es un marcador fluorescente hidrofílico de bajo peso molecular que es capaz de permear por vía paracelular. Se mide su capacidad de difusión tras 30 min y 1 h de incubación a 37°C (con la preparación de la correspondiente curva de calibrado patrón), mediante fluorimetría a  $\lambda_{exc} = 485 \text{ nm}$  y  $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$ , según el protocolo descrito por el fabricante de los Transwell (Corning). Se determina la permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ) del LY mediante la fórmula descrita más adelante. Cuando la permeabilidad del LY es menor del 2%, las condiciones de la monocapa (su integridad y continuidad) son adecuadas para realizar el tratamiento.

- Para los estudios de transporte en la dirección apical-basal (que imitaría el paso de sangre a cerebro), los compuestos liquénicos se disuelven a la concentración deseada en un búfer de transporte compuesto por HBSS y HEPES 10 mM; si se adiciona previamente DMSO, la concentración en pocillo es siempre  $< 0,1\%$ .
- Se adicionan 300  $\mu\text{l}$  de los compuestos a la concentración de ensayo (5  $\mu\text{g/ml}$ ) en el compartimento apical y 1000  $\mu\text{l}$  de búfer de transporte en el basal, durante 24 h.
- Tras ello, se toma una muestra (500  $\mu\text{l}$ ) del compartimento basal que se va a analizar por HPLC (según el protocolo descrito en el apartado 2.1.), con el fin de cuantificar la cantidad de compuesto que atravesara la monocapa celular. Previo al análisis, las muestras se filtran a través de filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Se utilizarán las curvas de calibrado de los cuatro metabolitos liquénicos preparadas para los ensayos de *uptake*.

Se calcula, por último, la permeabilidad aparente de cada compuesto liquénico mediante la siguiente fórmula:

$$P_{app} = (\text{Flux} \times V_d) / (t \times A)$$

Donde:  $P_{app}$  es la permeabilidad aparente de cada compuesto (cm/seg);  $V_d$  es el volumen de la cámara donadora apical ( $\text{cm}^3$ ); **Flux** es el flujo o fracción de la cantidad donada (en el compartimento apical) que se recupera en el compartimento receptor o basal;  $t$  es el tiempo de incubación con el compuesto (segundos); y  $A$  es el área de la membrana del inserto ( $\text{cm}^2$ ).



## 2.6. Estudio filogenómico del micobionte de *Cetraria islandica*

### 2.6.1. Secuenciación y ensamblaje del genoma

#### 2.6.1.1. Cultivo del micobionte

El cultivo se realiza a partir de un espécimen fértil de *Cetraria islandica* (L.) Ach recolectado en Riofrío de Riaza, en la Sierra de Ayllón (41°12'52"N / 03°24'48"W, Segovia, España), en diciembre de 2015. El espécimen se identificó morfológicamente y fue autenticado taxonómicamente por la Dra. Ana M. Crespo de las Casas. Se dejó secar al aire y se depositó en el Herbario de la Facultad de Farmacia UCM (código MAF 17201).

Una vez confirmada su identidad, los apotecios del espécimen fresco y fértil de *C. islandica* se aislaron manualmente a partir del talo liquénico bajo una lupa. Los apotecios aislados se sometieron al siguiente proceso de lavado: lavado inicial con agua destilada durante 15 min, seguido de un lavado con una solución de polietilenglicol al 0,5% y dos lavados finales de 15 min con agua destilada. Los apotecios lavados se colocan sobre la tapa de placas Petri invertidas que contienen medio de cultivo pobre (agar-agua) y se mantienen durante una noche para que esporulen. De esta forma, las esporas fúngicas individuales se proyectan en las placas con medio cultivo pobre, que favorecerá su germinación. Aquellas esporas que germinan se transfieren posteriormente a placas que contienen medio de cultivo de crecimiento Corn Meal Agar diluido en agua (Fluka, Suiza).

Las colonias en desarrollo se mantienen a 16°C y oscuridad, monitorizando su crecimiento. Una vez que presentan un desarrollo adecuado, las colonias del micobionte se sub-cultivan periódicamente en nuevas placas con medio fresco de levadura de malta. Para el sub-cultivo, se separan mecánicamente las partes de micelio de las colonias más desarrolladas y, posteriormente, se re-siembran en una placa con medio fresco.

El paso previo a proceder a la extracción y secuenciación del ADN genómico consiste en la identificación genética del micelio del micobionte en cultivo. El objetivo es confirmar su identidad y descartar la contaminación con otros hongos (p. ej., hongos endófitos). En este punto, se busca amplificar la región ITS fúngica (*nuclear ribosomal internal transcriber spacer*) del ADN ribosomal (Schoch y col., 2012) mediante un **ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**, con el empleo de los cebadores o *primers* ITS1F y ITS4A (Manter y Vivanco, 2007), específicos de hongos. Se realiza siguiendo el protocolo previamente descrito por White y col. (1990), con modificaciones, tal y como se detalla a continuación.

**Técnica de PCR.** Utilizando una lupa binocular (Leica Wild M8, Wild Heerbrugg, Suiza), unas pinzas de disección y una cuchilla, se toman lóbulos periféricos del espécimen, eliminando impurezas tales como restos de sustrato y organismos ajenos visibles (hongos liquenícolas, briófitos, etc.). Se depositan 10-30 mg de peso seco en varios tubos eppendorf estériles. El ADN genómico total se extrae utilizando el equipo comercial DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, España), siguiendo las instrucciones del mismo con algunas modificaciones descritas en Crespo y col. (2001).

Posteriormente, se realizan las amplificaciones de la región correspondiente al ITS ADNr nuclear, para lo cual se preparan diluciones (1:10) de la solución de ADN extraído. Las reacciones se llevan a cabo en un volumen total de 25 µl. La mezcla de reacción consta de 13,87 µl de agua miliQ, 2,5 µl de tampón 10X (Biotools, Madrid, España) (que incluye MgCl<sub>2</sub> 2 mM, KCl 50 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 mM), 0,5 µl de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 10 mM, 1,25 µl de cada uno de los *primers* (10 µM) y 0,625 µl de ADN polimerasa (1U/µl). A 20 µl de dicha mezcla se adicionaron 5 µl de ADN de la muestra. Las amplificaciones se realizan en un termociclador automático (Techne Progene, Jenson Bolton & Co. Ltd., Watford, Reino Unido). Las condiciones de PCR utilizadas en la amplificación son: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos a 94°C durante 1 min, 54-56°C durante 1 min, y 72°C durante 1,5 min. Extensión final a 72°C durante 10 min.

Los productos obtenidos de la amplificación se visualizan y cuantifican mediante electroforesis (100 V, 25 min) sobre geles de agarosa al 1% (p/v), con adición al gel de una cantidad equivalente al 5% p/v de SYBR Safe DNA gel stain (10,000X en DMSO). En cada pocillo del gel, se adicionan 4 µl de producto de PCR. Los geles se visualizan en un transiluminador de luz UV. La concentración y tamaño de los fragmentos separados durante la electroforesis se estima por comparación con un patrón de peso molecular conocido (Bio-Rad 50-1000 pb). Los fragmentos amplificados mediante PCR se purifican utilizando la enzima exoSAP-I, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR purificados se cuantifican de nuevo por electroforesis y comparación con patrón de peso molecular.

Los productos purificados (concentración aprox. 10-30 ng/µl) se secuencian (Centro de Genómica, Parque Científico de Madrid, UCM) utilizando el kit de reacción Big Dye® Terminator V 3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, CA, EEUU). Los cebadores utilizados en la secuenciación son los mismos que los empleados en las reacciones de PCR. Las condiciones de las reacciones de secuenciación fueron: 94°C durante 3 min, y 25 ciclos de 96°C durante 10 seg, 50°C durante 5 seg y 60°C durante 4 min. Las reacciones se analizan en un secuenciador automático de ADN 3730 (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas en dirección 5'→3' y 3'→5' de cada uno de los productos de PCR fueron comparadas y ajustadas manualmente utilizando el programa SeqMan 4.03 (DNASTAR, Madison, EEUU).

La secuencia de ITS obtenida a partir del ADN ribosomal del micelio en cultivo se analiza mediante la función BLAST del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*); ésta realiza un análisis comparativo con aquellas secuencias ITS depositadas en diferentes bases de datos (incluyendo GenBank, entre otras) y proporciona un porcentaje de similitud entre la

secuencia problema y la secuencia más próxima existente en las bases de datos. El resultado confirmó la identificación del micobionte en cultivo como *Cetraria islandica* (L.) Ach., con un más de un 99% de identidad entre las secuencias ITS previamente secuenciadas para dicha especie y la secuencia ITS amplificada del cultivo, lo cual indica que se tiene un cultivo puro de un único hongo.

### 2.6.1.2. Análisis fitoquímico

Con el objetivo de verificar la producción de metabolitos secundarios por el micobionte aislado en cultivo, se realiza una extracción en metanol a partir de varias colonias fúngicas, mediante el procedimiento descrito en el punto 2.1.1. de Material y Métodos. El residuo seco obtenido se reconstituyó en metanol y se analizó por HPLC, mediante el protocolo detallado en el punto 2.1.3.

### 2.6.1.3. Secuenciación del genoma

Para conseguir la secuenciación del genoma del micobionte de *Cetraria islandica* en cultivo, se requiere un primer paso de **extracción del ADN genómico**. Para ello, se sigue el protocolo descrito por Cubero y Crespo (2002) con modificaciones, mediante el **procedimiento** que se resume a continuación:

- Las colonias del micobionte (aproximadamente 2 g de micelio) se extraen de las placas de cultivo y se eliminan los restos de medio de cultivo.
- Se favorece la disrupción del tejido mediante su congelación con N<sub>2</sub> líquido y la pulverización con mortero. Se repite este paso 2-3 veces.
- El micelio pulverizado se homogeneiza con tampón de lisis que contiene Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), EDTA 30 mM, NaCl 1M, CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) 1% (v/v) y polivinilpirrolidona (PVP) 1% (p/p). El homogeneizado se incuba a 65°C (1 h) y posteriormente se transfiere a tubos de plástico PPCO (copolímero de polipropileno), donde se añaden 10 µg/ml de RNAasa y se incuba de nuevo a 65°C (30 min), a fin de digerir los restos de ARN en la muestra que pueden interferir en la calidad de la secuenciación.
- Se añade el mismo volumen de cloroformo y se centrifuga (12000 rpm, 5 min), consiguiendo una primera extracción de ADN. El sobrenadante (fase acuosa) se recoge, y la fase orgánica (con los detritus celulares) se elimina.

- Los sobrenadantes se distribuyen en alícuotas, a las que se añaden tres volúmenes de tampón de precipitación (NaCl 40 mM y CTAB 0,5%). Esa mezcla se agita vigorosamente y se centrifuga (16000 rpm, 10 min) para precipitar el ADN.
- Los pellets resultantes se re-suspenden en NaCl 1,2 mM y se mezclan de nuevo con el mismo volumen de cloroformo para una segunda extracción de ADN genómico (centrifugación a 12000 rpm, 5 min).
- Se recolecta la fase acuosa y se añaden 0,7 volúmenes de isopropanol para precipitar el ADN (centrifugación a 16000 rpm, 10 min). Los pellets resultantes se lavan con etanol al 70% (centrifugación a 16000 rpm, 5 min).
- El ADN genómico presente en el pellet final, una vez seco, se disuelve en agua destilada y se comprueba su concentración y pureza por fluorimetría (Qubit fluorometer, Thermo Fisher Scientific). Además, la muestra de ADN se analiza en gel de agarosa al 1% (p/v) para comprobar su peso molecular y la posible degradación, y se almacena a -20°C hasta su uso.

El ADN genómico extraído es secuenciado (StarSEO GmbH, Mainz, Alemania) mediante dos secuenciadores Illumina MiSeq e Illumina NextSeq (Illumina Inc., CA, EEUU), de manera que se obtienen finalmente una librería genómica de secuencias pareadas *paired-end*, formada por fragmentos de ADN o *reads* de ~600 pares de bases (pb) de longitud, y dos librerías *mate-pairs* de 3000 y 8000 pb con *reads* de pequeña longitud (~150 pb).

#### **2.6.1.4. Ensamblaje de los *contigs* y *scaffolding***

Herramientas informáticas empleadas (sistema operativo Linux):

- Trimmomatic y NxTrim: programas con soporte Java que permiten limpiar las secuencias de ADN obtenidas, ya que éstas incluyen los adaptadores utilizados por la tecnología de secuenciación Illumina, así como los extremos de las secuencias de baja calidad, que deben ser eliminados.
- Sickle: software utilizado para la limpieza de regiones de baja calidad de secuenciación (extremos 3' y 5' de los *reads*), que permite descartar *reads* por criterios de longitud.
- Pear: programa que realiza un solapamiento de secuencias *paired-end* por complementariedad de pares de bases (alta velocidad y reducido consumo de memoria). Analiza todos los posibles solapamientos e implementa un test estadístico para minimizar los falsos positivos.
- SPAdes: software ensamblador de genomas con un algoritmo de trabajo inicialmente diseñado para genomas bacterianos, que ha demostrado ser eficaz para genomas fúngicos. Trabaja bien con una cobertura de genoma no uniforme e incluye un software de corrección de errores (BayesHammer). Es específico para lecturas Illumina y genera, por ensamblaje de *reads* individuales, *contigs* de mayor tamaño. Tiempo de trabajo relativamente rápido y uso medio de RAM.

- SSPACE: programa que permite la formación de *scaffolds* a partir de *contigs* previamente ensamblados desde secuencias *paired-end*. Utiliza criterios de evaluación de orden, distancia y orientación de los *contigs* para combinarlos hasta *scaffolds*. Funciona en la línea de comandos Perl.
- Gapfiller: programa utilizado para cerrar los espacios entre los *scaffolds* pre-ensamblados, a fin de favorecer la formación de un genoma más completo y continuo. Tiene en cuenta el espacio a rellenar y extiende los *contigs* desde los extremos por un solapamiento con otros *reads*, basado en los gráficos de Brujin (*K-mers*).
- Assemblathon: software capaz de evaluar el método utilizado para el ensamblaje *de novo* de un determinado genoma; estima características y parámetros de calidad del genoma en cuestión.
- Megan: programa que permite analizar grandes conjuntos de datos metagenómicos para proporcionar una asignación taxonómica de los mismos por comparación con una determinada base de datos de secuencias de ADN.
- Diamond: es una herramienta que permite el alineamiento de secuencias relativamente cortas de ADN frente a las bases de datos de referencia, que pueden incluir secuencias genéticas o proteomas (p. ej., NCBI). Mejora en gran medida la velocidad de análisis respecto a su predecesor BLASTX.
- BUSCO: software que permite evaluar la calidad de un genoma ensamblado. Determina el grado de completitud del mismo, así como de potenciales duplicidades en genes, mediante un análisis basado en la estimación del contenido de genes ortólogos de copia única según el tipo de organismo.

El **procedimiento** secuencial se detalla a continuación:

En primer lugar, se realiza la limpieza (*trimming*) de las secuencias de ADN o *reads* obtenidos tras la secuenciación del ADN genómico del micobionte (en archivos FastQ), usando los programas Trimmomatic (Bolger y col., 2014) y NxTrim (O'Connell y col., 2015). Estos softwares se utilizan para limpiar las librerías *paired-end* y *mate-pairs*, respectivamente. Seguidamente, se realiza un nuevo paso de *trimming* mediante el programa Sickle (Joshi y Fass, 2011), aplicado a ambas librerías de fragmentos de ADN.

El paso siguiente consiste en realizar un solapamiento (*overlapping*) preliminar de los *reads* de la librería *paired-end* mediante el uso del programa Pear (Zhang y col., 2014), previo al ensamblaje del genoma. Para el ensamblaje *de novo* del genoma se utiliza como programa principal SPAdes (Bankevich y col., 2012), aplicando la opción metódica (*careful option*) y los siguientes parámetros *K-mer*: -k 21,33,55,77,99,127. Los *contigs* resultantes del ensamblaje de los *reads* con SPAdes se van a ensamblar y solapar aún más hasta la formación de *scaffolds* mediante la utilización del programa SSPACE (Boetzer y col., 2011) y el consiguiente uso de GapFiller (Boetzer y Pirovano, 2012), para obtener un ensamblaje más completo y un genoma

más cerrado y sin espacios. El resultado y las características finales del genoma se analizan con Assemblathon 2 (Bradnam y col., 2013).

Con el objetivo de descartar una potencial contaminación bacteriana, vírica o fúngica, se lleva a cabo la asignación taxonómica de los *scaffolds* (resultantes de la unión de *contigs* por complementariedad de bases) de *C. islandica* frente a la base de datos derivada del trabajo de Greshake y colaboradores (2016), usando la herramienta *blastx* implementada en el software DIAMOND (Buchfink y col., 2015), que se basa en el alineamiento de secuencias de ADN. A partir del resultado de ese análisis, la anotación taxonómica de los *scaffolds* se realiza con el programa Megan v.5 (Huson y col., 2016), y permite extraer los *scaffolds* asignados a la familia *Parmeliaceae*, y así trabajar con un criterio de calidad más exigente.

Una vez se obtuvo el ensamblaje final del genoma, se analizó su grado de completitud y el nivel de duplicidades mediante el programa BUSCO (Simão y col., 2015).

## 2.6.2. Anotación del genoma y predicción de genes biosintéticos

Herramientas informáticas empleadas:

- MAKER 2: software basado en una secuencia de trabajo compleja que permite anotar genes a partir de la información combinada procedente de cuatro programas predictores de genes diferentes: SNAP, Augustus y GeneMark. Permite la descripción de la estructura (p. ej., intrones, exones, etc.) y función de los genes.
- Blast2Go: programa bioinformático que proporciona la anotación funcional de nuevas secuencias de genes o proteínas. Se basa en el algoritmo BLAST para identificar secuencias similares y transferir la anotación funcional existente desde secuencias que ya han sido caracterizadas a las secuencias problema nuevas. Aporta información funcional que se representa como ontología de genes (vocabulario específico para la anotación funcional en todas las especies).
- AntiSMASH 3.0.: programa descrito más adelante.

El **procedimiento** secuencial es el siguiente:

La predicción inicial de los genes en el genoma de *Cetraria islandica* se realiza mediante el software MAKER2 (Holt y Yandell, 2011). La anotación final de los genes en dicho genoma se realiza mediante el programa Blast2GO (Conesa y col., 2005).

El genoma anotado previamente se somete a un análisis por AntiSMASH (*Antibiotics and Secondary Metabolites Analysis Shell*, versión 3.0) (Weber y col., 2015), que proporciona una

identificación *in silico* de los posibles genes biosintéticos y su anotación en las secuencias del genoma previamente introducidas (en formato FASTA). Para este fin, AntiSMASH utiliza el algoritmo de pHMM (*profile Hidden Markov Model*) para predecir y clasificar los distintos dominios (y su arquitectura) de las enzimas responsables de la síntesis de metabolitos secundarios. Se basa en el alineamiento de secuencias entre el genoma problema y múltiples *clusters* o agrupaciones de genes biosintéticos (de la base de datos del NCBI, *National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine*) caracterizados teórica o experimentalmente. Así, es capaz de predecir las principales enzimas biosintéticas modulares de hongos, tales como las poliquétido sintasas (PKSs), además de sintetasas de péptidos no-ribosomales (NRPSs) y sintetasas de terpenos. Así mismo, permite la identificación de otras enzimas comunes a algunas rutas biosintéticas, como es el caso de las enzimas adaptadoras (p. ej., óxido-reductasas, metiltransferasas, etc.). La anotación “manual” previa del genoma con MAKER2 y Blast2GO es aconsejada por los desarrolladores de AntiSMASH para obtener mejores resultados y maximizar la identificación de *clusters* de genes biosintéticos.

### 2.6.3. Análisis de la filogenia de secuencias proteicas de KS

Herramientas informáticas empleadas:

- CIPRES: es un portal bioinformático público (<http://www.phylo.org/subsections/portal/>) que permite realizar estudios y construir grandes árboles filogenéticos a través de varios métodos de inferencia filogenética, entre los que se incluye la inferencia por el método de máxima verosimilitud (para lo cual utiliza la herramienta RAxML).
- MAFFT: es un software específico para el alineamiento de secuencias proteicas que ofrece un amplio rango de métodos de alineamiento: L-INS-i (preciso; para el alineamiento de ~200 secuencias), FFT-NS-2 (rápido; para alineamientos de ~30,000 secuencias), etc.
- ProtTest: programa que analiza secuencias proteicas problema y determina el modelo bioinformático más adecuado para el estudio filogenético de las mismas y la construcción de árboles.

Con el objetivo de discriminar la existencia de un posible gen candidato en el genoma de *C. islandica* implicado en la síntesis del ácido fumarprotocetrárico, realizamos una aproximación filogenética. Para ello, mediante el uso del portal CIPRES Science Gateway (Miller y col., 2010), se construye un árbol filogenético de las secuencias aminoacídicas de las regiones ketosintasa (KS) correspondientes a los *clusters* biosintéticos identificados como PKSs (por AntiSMASH) en el nuevo genoma de *C. islandica*. Se incluyen las regiones KS tanto de las PKS reductoras como no reductoras, y se analizan junto a regiones KS identificadas en otras

especies de hongos (incluyendo otros líquenes), que han sido extraídas de la base de datos MIBiG (*Minimum Information about a Biosynthetic Gene Cluster*, disponible en <http://mibig.secondarymetabolites.org/repository.html>), y de la literatura científica (Armaleo y col., 2011; Abdel-Hameed y col., 2016). MIBiG es la mayor base de datos conocida de *clusters* biosintéticos, de gran utilidad en el descubrimiento de nuevas enzimas fúngicas y metabolitos secundarios (Medema y col., 2015). Para completar el estudio filogenético, también se incluyeron otras regiones KS obtenidas de otras bases de datos disponibles en <http://www.secondarymetabolites.org/>, como es el caso de ClusterMine360 y ClustScan Database (Li y col., 2016). Se usaron, por tanto, un total de 253 secuencias KS, las cuales están todas disponibles en GenBank.

El alineamiento inicial de las secuencias proteicas se llevó a cabo utilizando el programa MAFFT (Yamada y col., 2016), utilizando el algoritmo L-INS-i, la matriz de puntuación BLOSUM62, y los siguientes parámetros: penalización por apertura de huecos de 1,53 y valor de compensación de 0,123. CIPRES aborda, posteriormente, el análisis filogenético mediante la utilización de RAxML versión 7.2.7 (Stamatakis, 2006), que basa la inferencia filogenética en el método de máxima verosimilitud. La construcción del árbol filogenético se realizó mediante el modelo LG+I+G+F (Le y Gascuel, 2008), que se había encontrado como el más adecuado mediante el análisis por ProtTest (Darriba y col., 2011). Se incluyó un *outgroup* o grupo de referencia compuesto por siete secuencias de genes de ácido graso sintasas de animales.

## 2.7. Análisis estadístico

Los datos numéricos obtenidos de cada muestra y de, al menos, tres experimentos biológicamente independientes se tratan con el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI (Statgraphics.Net, Madrid, España). Los resultados se expresan como: media  $\pm$  desviación estándar (DE). La significación estadística de los resultados se determina por el análisis de la varianza (ANOVA simple) seguido del test de Tukey para comparaciones múltiples. Las diferencias entre los valores de las medias se consideran estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$  (margen de confianza del 95%). Las diferencias significativas se expresan con asterisco (\*) respecto al control, y con almohadilla (#) respecto al tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



# RESULTADOS

-----

## 1. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS DE LÍQUENES PARMELIÁCEOS

### 1.1. Rendimiento de la extracción y contenido en polifenoles

El procedimiento de extracción de metabolitos secundarios a partir de especímenes líquénicos (maceración en metanol) permite obtener rendimientos variables según las especies. En la Tabla 11 se recogen los resultados para las distintas especies estudiadas. El rendimiento más bajo lo presenta la extracción del espécimen de *Cetraria islandica* (3,44% peso/peso), mientras que el de *Evernia prunastri* tiene el mayor rendimiento (14,13%) (Tabla 11).

Además, el contenido en polifenoles de los distintos extractos se correlaciona con el rendimiento de la extracción de cada espécimen. Así, se comprueba que los extractos de *Evernia prunastri* y *Cetrelia braunsiana* son los que presentan un mejor rendimiento de la extracción e, igualmente, un mayor contenido en polifenoles (161,96 y 128,02 µg ácido gálico/mg extracto seco) (Tabla 11).

Especie	Rendimiento de la extracción (% p/p)	Contenido en polifenoles (µg AG/mg extracto seco)
<i>Cetraria islandica</i> (L.) Ach.	3,44 ± 0,19	57,34 ± 3,30
<i>Cetrelia braunsiana</i> (Müll. Arg.) W.L. Culb. & C.F. Culb.	12,42 ± 0,69	128,02 ± 15,47
<i>Evernia prunastri</i> (L.) Ach.	14,13 ± 0,93	161,96 ± 8,12
<i>Parmotrema saccatilobum</i> (Taylor) Hale	8,67 ± 0,58	103,14 ± 6,68
<i>Usnea ghattensis</i> G. Awasthi	3,99 ± 0,34	41,43 ± 0,16
<i>Vulpicida canadiensis</i> (Räsänen) J.-E. Mattson & M.J. Lai	7,83 ± 0,43	34,93 ± 1,40

Tabla 11. Rendimientos de la extracción en metanol de los especímenes líquénicos, y su contenido en polifenoles.

## 1.2. Actividades antioxidante y neuroprotectora en un modelo celular de estrés oxidativo

### 1.2.1. Capacidad de captación de radicales libres

Se ha determinado la capacidad captadora (*scavenger*) de radicales libres de los extractos metanólicos en estudio, por considerarse uno de los mecanismos por el cual los agentes antioxidantes pueden ejercer una reducción del estrés oxidativo.

En el **ensayo de ORAC**, se ha observado una reducción de la fluorescencia debida a fluoresceína en presencia de los radicales peroxilo generados por la termo-descomposición del azo-compuesto AAPH. La atenuación de esta caída de fluorescencia varía según capacidad de captar radicales peroxilo (*scavenger*) de las muestras en estudio. Para calcular la capacidad antioxidante de cada extracto, se prepara una curva patrón de trolox que permite expresar los valores ORAC como  $\mu\text{moles equivalentes de trolox (ET)}/\text{mg}$  muestra (Figura 19). Los valores de ORAC superiores a 1  $\mu\text{mol ET}/\text{mg}$  muestra indican que la muestra presenta una mayor AUC y ejerce una mayor captación de radicales peroxilo que el trolox (antioxidante de referencia), bajo las condiciones experimentales utilizadas.

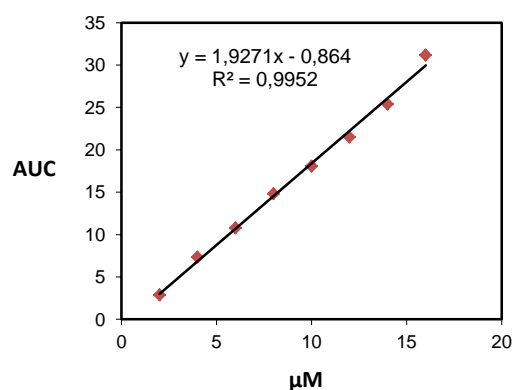


Figura 19. Curva patrón de trolox con regresión lineal de área bajo la curva a diferentes concentraciones.

El extracto metanólico de *Evernia prunastri* demostró el mayor valor de ORAC y, por tanto, la mayor capacidad antioxidante en este ensayo. En cambio, el extracto metanólico de *Vulpicida canadensis* fue la muestra con menor capacidad de captar radicales peroxilo (Tabla 12).

Los resultados del **ensayo de DPPH** (Tabla 12) indican que los extractos metanólicos no presentan actividades *scavengers* muy marcadas frente al radical DPPH, en términos de comparación con el trolox ( $IC_{50} = 5,51 \mu\text{g/ml}$ ). Los extractos que muestran mayor capacidad de captación del radical DPPH son los obtenidos a partir de *Vulpicida canadensis* y *Evernia prunastri*.

En la Tabla 12 se reflejan todos los resultados obtenidos para las distintas muestras líquénicas en los ensayos de captación de radicales libres.

Extracto metanólico	Valor de ORAC ( $\mu\text{moles ET/mg muestra}$ )	DPPH $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>Cetraria islandica</i> (Ci)	$3,06 \pm 0,31$	1183,55
<i>Cetrelia braunsiana</i> (Cb)	$3,21 \pm 0,17$	934,72
<i>Evernia prunastri</i> (Ep)	$8,44 \pm 0,28$	660,61
<i>Parmotrema saccatilobum</i> (Ps)	$4,38 \pm 0,41$	720,43
<i>Usnea ghattensis</i> (Ug)	$4,74 \pm 0,09$	792,43
<i>Vulpicida canadensis</i> (Vc)	$0,77 \pm 0,08$	99,83

Tabla 12. Resultados obtenidos para los extractos metanólicos de las distintas especies en estudio en los ensayos de actividad captadora de RL.

### 1.2.2. Estudio de la viabilidad celular y citotoxicidad

Como paso previo al estudio de la actividad neuroprotectora de los extractos líquénicos en un modelo celular de estrés oxidativo, se ha determinado el rango de concentraciones no citotóxicas de cada uno de ellos sobre las líneas celulares SH-SY5Y y U373-MG. Se ha evaluado la viabilidad celular mediante los ensayos de reducción de MTT y de actividad LDH.

#### 1.2.2.1. Ensayo de reducción de MTT

El ensayo de MTT mide la actividad enzimática mitocondrial intracelular y nos ha permitido seleccionar las concentraciones no citotóxicas de cada extracto para ser testadas posteriormente con el fin de analizar su capacidad citoprotectora. Las células SH-SY5Y y las U373-MG se han tratado durante 24 h con diferentes concentraciones de las muestras en un rango de 0,25 a 250  $\mu\text{g/ml}$ .

### 1.2.2.1.1. Modelo celular SH-SY5Y

La Figura 20 recoge los resultados de viabilidad celular obtenidos en el ensayo de MTT para la línea celular SH-SY5Y. Los tratamientos con concentraciones superiores a 50  $\mu\text{g/ml}$  de todos los extractos ejercen citotoxicidad y provocan una reducción significativa de la actividad mitocondrial (como indicador de viabilidad celular) que es concentración-dependiente. Las concentraciones más bajas ensayadas, entre 0,25 y 5  $\mu\text{g/ml}$ , no presentan efectos citotóxicos, con valores de reducción de MTT superiores al 90%. Entre 5 y 50  $\mu\text{g/ml}$ , se observan valores variables de viabilidad celular entre las distintas muestras. El Tritón X-100, utilizado como control negativo, genera una excesiva citotoxicidad, reduciendo efectivamente la viabilidad de las células SH-SY5Y hasta el 19,15%.

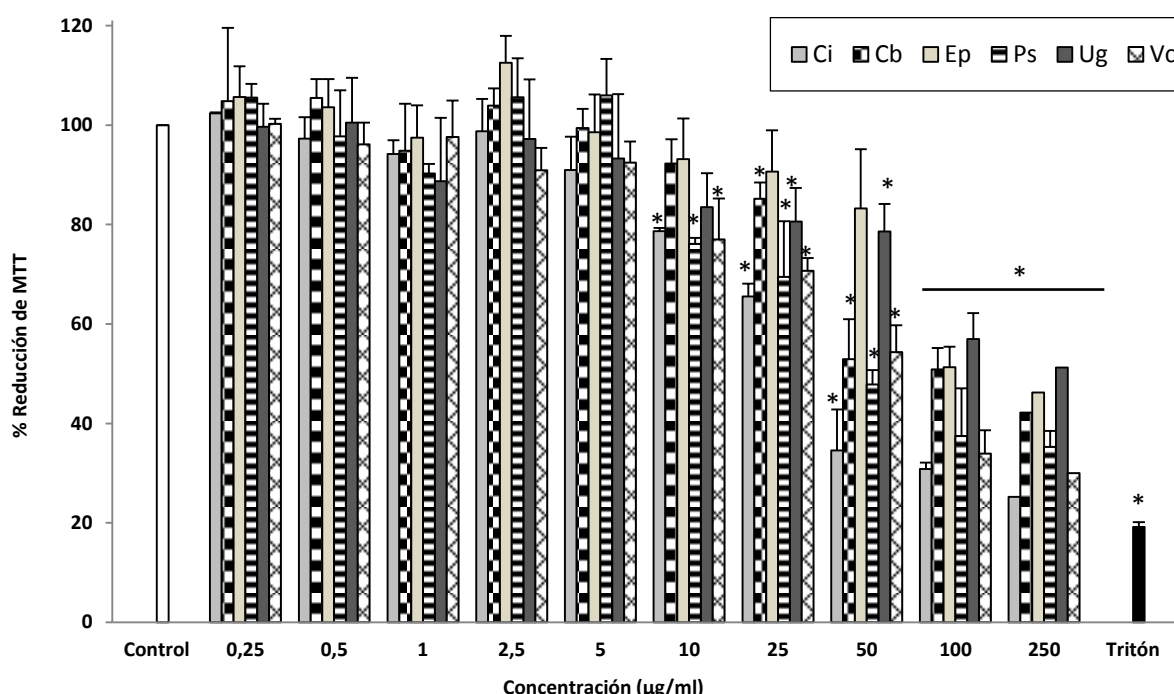


Figura 20. Resultados de viabilidad celular de la línea SH-SY5Y bajo los tratamientos (24 h) con los seis extractos metanólicos. Ci: *Cetraria islandica*, Cb: *Cetrelia braunsiana*, Ep: *Evernia prunastri*, Ps: *Parmotrema saccatilobum*, Ug: *Usnea ghattensis*, Vc: *Vulpicida canadensis*. La reducción de MTT se expresa como % respecto al control (100% de viabilidad). Los resultados se expresan como media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$  versus control.

### 1.2.2.1.2. Modelo celular U373-MG

Las células U373-MG se tratan con las distintas muestras de extractos metanólicos en un amplio rango de concentraciones (0,25 - 250  $\mu\text{g/ml}$ ), durante 24 h y a 37°C. La Figura 21 presenta los efectos sobre la viabilidad celular en esta línea celular modelo de astrogliá.

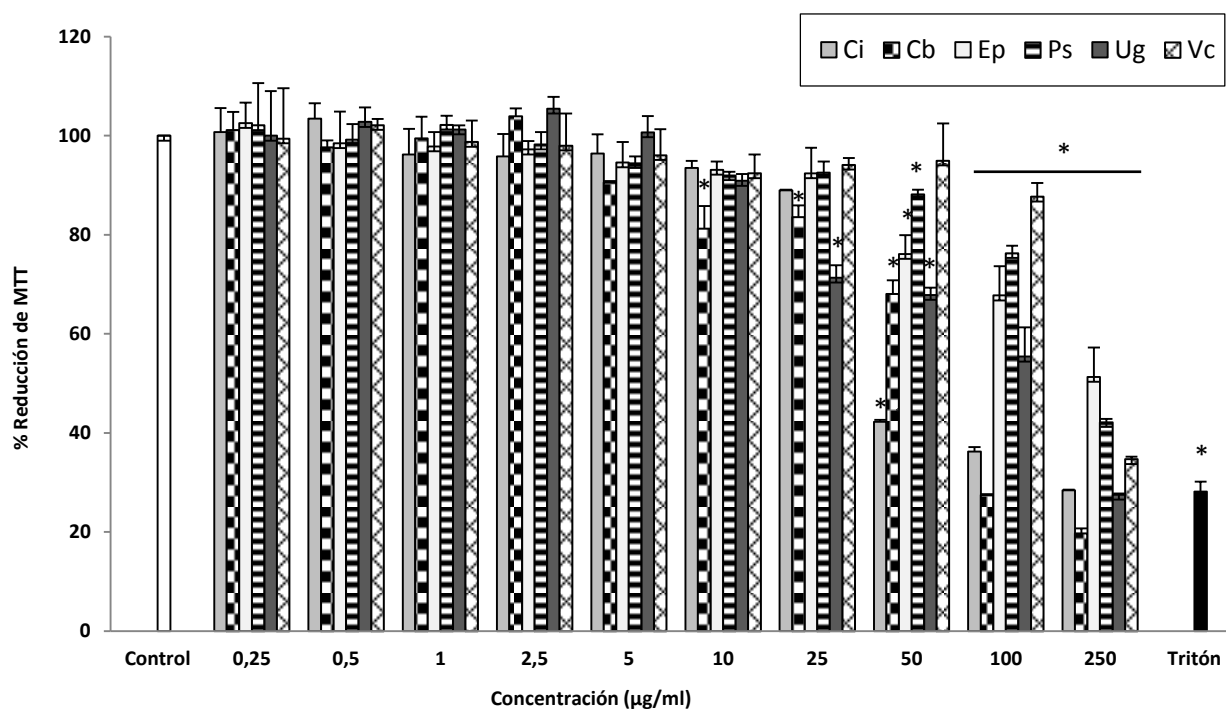


Figura 21. Resultados de viabilidad celular de la línea U373-MG bajo los tratamientos (24 h) con los seis extractos metanólicos. Ci: *Cetraria islandica*, Cb: *Cetrelia braunsiana*, Ep: *Evernia prunastri*, Ps: *Parmotrema saccatilobum*, Ug: *Usnea ghattensis*, Vc: *Vulpicida canadensis*. La reducción de MTT se expresa como % respecto al control (100% de viabilidad). Los resultados se expresan como media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$  versus control.

De los resultados obtenidos, podemos concluir que las concentraciones más elevadas (100-250  $\mu\text{g/ml}$ ) de los extractos en estudio reducen de forma significativa la viabilidad celular de las células U373-MG. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con las células SH-SY5Y, algunos tratamientos a la concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$  no generan citotoxicidad. Las células U373-MG se muestran, por tanto, más resistentes que las células SH-SY5Y a los mismos tratamientos. Para todos los tratamientos, las concentraciones de 25  $\mu\text{g/ml}$  e inferiores no afectan a la viabilidad celular de estas células, con la excepción del extracto de *Usnea ghattensis* (Ug) que sí resulta citotóxico a 25  $\mu\text{g/ml}$ . El Tritón X-100 ejerce una marcada citotoxicidad, reduciendo la viabilidad hasta el 28,15%.

#### 1.2.2.2. Ensayo de actividad LDH

El ensayo de actividad lactato deshidrogenasa (LDH) total evalúa la integridad de membrana y se utiliza para confirmar el rango de concentraciones en que los distintos tratamientos no afectan a la viabilidad celular. Se han evaluado, en este caso, cuatro concentraciones de cada muestra en el rango de 5 a 100  $\mu\text{g/ml}$ .

### 1.2.2.2.1. Modelo celular SH-SY5Y

Los resultados del ensayo de actividad LDH muestran un efecto concentración-dependiente de todos los extractos sobre la actividad de la enzima liberada. Concentraciones superiores a 50  $\mu\text{g/ml}$  de todos los tratamientos comprometen la integridad de la membrana plasmática de las células SH-SY5Y (modelo de neurona), afectando significativamente a la viabilidad celular en comparación con las células control no tratadas, y confirmando así los resultados del ensayo de MTT. En el rango de 50 a 100  $\mu\text{g/ml}$ , los extractos liquénicos generan una liberación de LDH similar a la producida por el tratamiento con Tritón, control negativo que genera la liberación del 59% de enzima LDH respecto a la enzima total en la célula. Si se compara entre los distintos tratamientos, el extracto obtenido a partir de *Evernia prunastri* es el que menos afecta a la integridad de membrana (Figura 22).

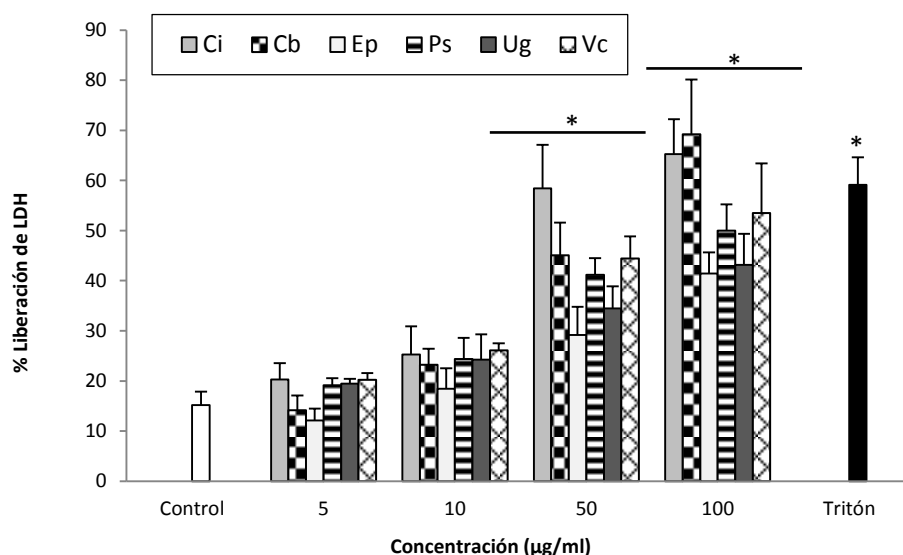


Figura 22. Resultados del ensayo de actividad LDH bajo los distintos tratamientos (24 h) con los extractos metanólicos. Ci: *Cetraria islandica*, Cb: *Cetrelia braunsiana*, Ep: *Evernia prunastri*, Ps: *Parmotrema saccatilobum*, Ug: *Usnea ghattensis*, Vc: *Vulpicida canadensis*. La viabilidad celular de la línea SH-SY5Y se expresa como porcentaje de liberación de LDH del citoplasma al citosol, con respecto a la cantidad total de enzima. Los resultados se expresan como media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$  versus control.

### 1.2.2.2.2. Modelo celular U373-MG

Los tratamientos con las muestras liquénicas generan similares resultados en la línea celular U373-MG en cuanto a liberación de enzima LDH. En general, se puede concluir que se requieren concentraciones inferiores a 50  $\mu\text{g/ml}$  para asegurar una correcta integridad de la membrana plasmática y valores de viabilidad celular similares a los de células control (Figura 23).

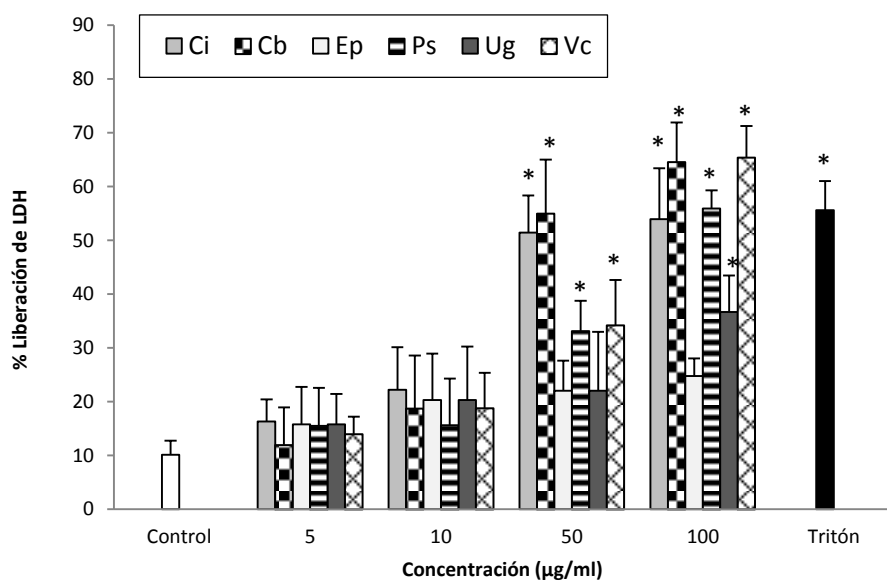


Figura 23. Resultados del ensayo de actividad LDH bajo los distintos tratamientos (24 h) con los extractos metanólicos. Ci: *Cetraria islandica*, Cb: *Cetrelia braunsiana*, Ep: *Evernia prunastri*, Ps: *Parmotrema saccatilobum*, Ug: *Usnea ghattensis*, Vc: *Vulpicida canadensis*. La viabilidad celular de la línea U373-MG se expresa como porcentaje de liberación de LDH del citoplasma al citosol, con respecto a la cantidad total de enzima. Los resultados se expresan como media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$  versus control.

### 1.2.3. Estudio de la actividad citoprotectora frente a estrés oxidativo

Una vez que se ha establecido el rango de concentraciones no citotóxicas para cada uno de los tratamientos con extractos liquénicos sobre las líneas celulares SH-SY5Y y U373-MG, procedemos a evaluar su efecto frente al daño celular inducido por peróxido de hidrógeno mediante el ensayo de reducción de MTT.

#### 1.2.3.1. Ensayo de reducción de MTT

Para determinar la capacidad de protección frente a estrés oxidativo de los extractos metanólicos, se utilizan las concentraciones que se determinan como no-citotóxicas para cada uno de ellos y en cada línea celular (mostradas en el apartado anterior). Se incuban las células durante 24 h con las muestras y a continuación se tratan durante 30 min con  $H_2O_2$ .

##### 1.2.3.1.1. Modelo celular SH-SY5Y

En el modelo de células de neuroblastoma, tras los tratamientos con los extractos, las células se someten a tratamiento con el tóxico generador de estrés oxidativo ( $H_2O_2$ ) a la concentración de 0,1 mM durante 30 min. Como se observa en la Figura 24, el  $H_2O_2$  provoca una pérdida de la funcionalidad mitocondrial (indicador de viabilidad celular) de un 45% comparado con el control positivo, representado por células sin tratar (100% de viabilidad).



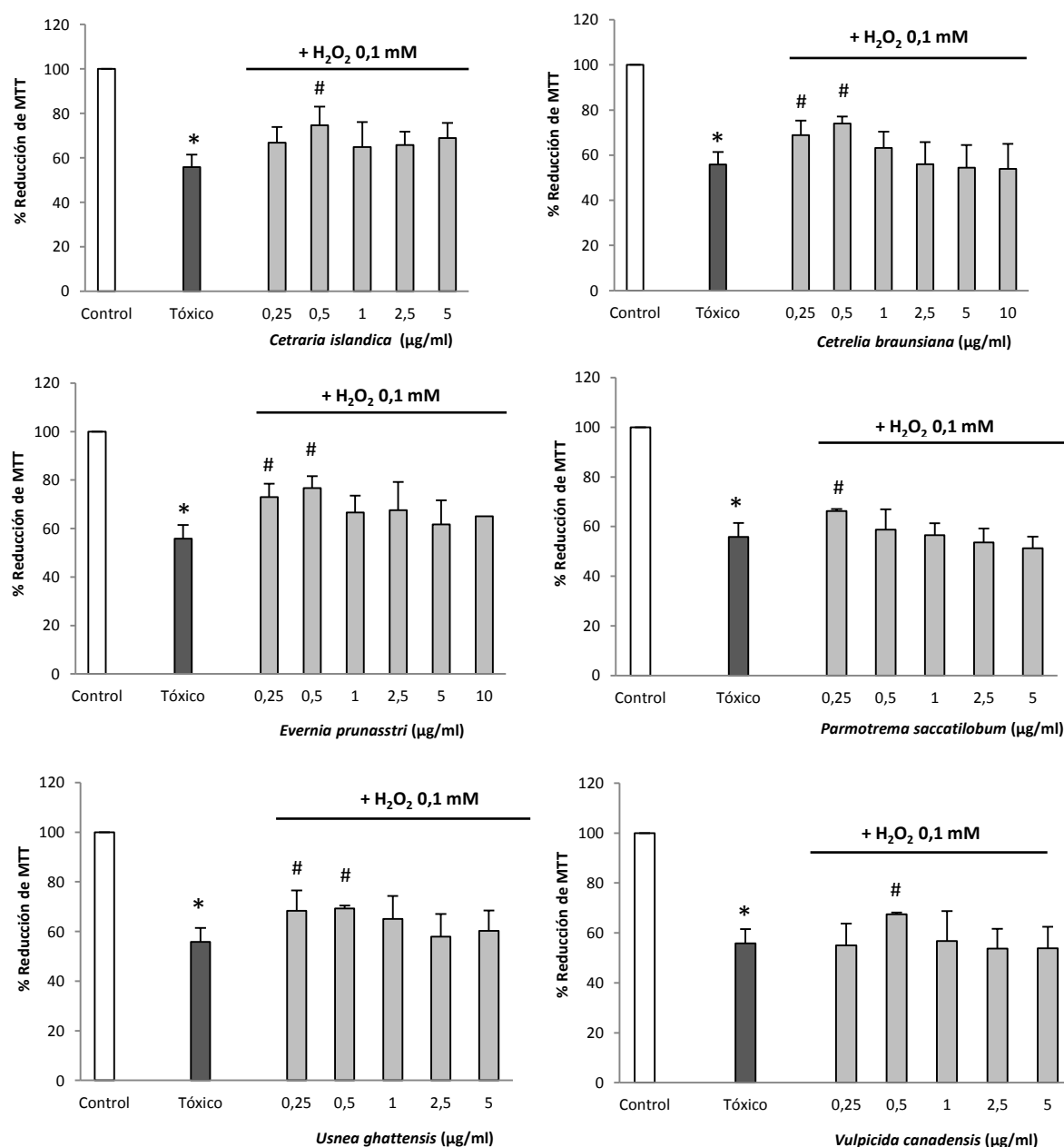


Figura 24. Efecto citoprotector frente al estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las células SH-SY5Y. Las células se incuban (24 h) con las concentraciones no citotóxicas de los extractos y posterior exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,1 mM durante 30 min. La viabilidad celular se expresa como reducción de MTT en % respecto al control de células sin tratar (100% de viabilidad). Los resultados se expresan como media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$  versus control; #  $p < 0,05$  versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tóxico: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La pre-incubación con algunas concentraciones de los distintos extractos es capaz de prevenir de forma significativa el efecto citotóxico que ejerce el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mejorando la actividad enzimática mitocondrial y aumentando, con ello, la reducción del MTT. Cabe destacar el pre-tratamiento con los extractos de Ep y Ci (a la concentración de 0,5 µg/ml) que ejercen la citoprotección más notable, incrementando la viabilidad celular un 21% y un 19%, respectivamente, en comparación con las células tratadas exclusivamente con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 1.2.3.1.2. Modelo celular U373-MG

En la línea celular U373-MG, el  $H_2O_2$  a la concentración de 1 mM (30 min) induce un estrés oxidativo que ejerce una citotoxicidad relevante y disminuye la viabilidad celular en un 40%. Sin embargo, de forma similar a lo que ocurre en la línea SH-SY5Y, ciertos pre-tratamientos (24 h) con los extractos son capaces de incrementar significativamente la viabilidad. En la Figura 25, se expresan los resultados obtenidos del efecto citoprotector.

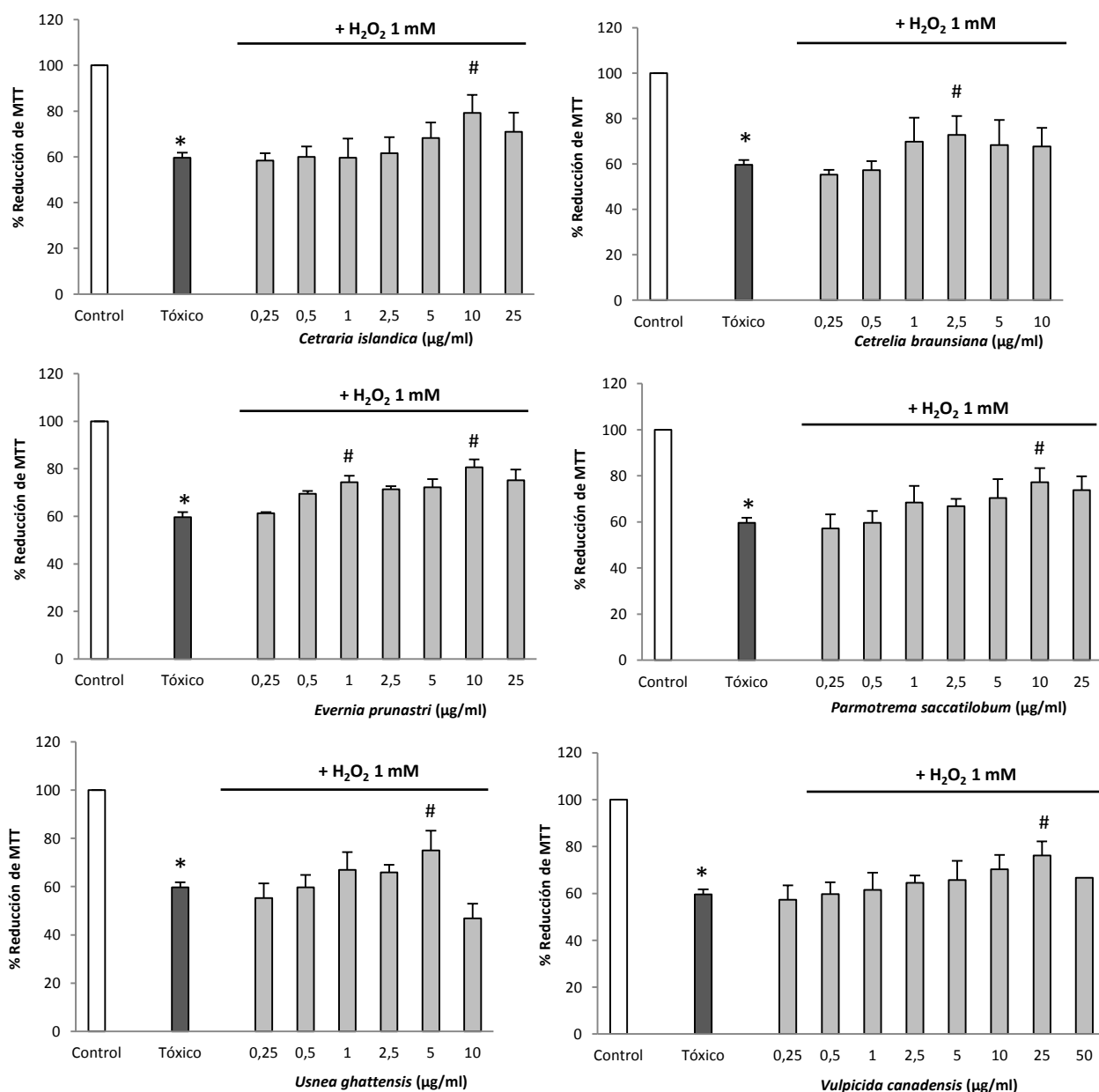


Figura 25. Efecto citoprotector frente al estrés oxidativo inducido por  $H_2O_2$  en las células U373-MG. Las células se incuban (24 h) con las concentraciones no citotóxicas de los extractos y posterior exposición a  $H_2O_2$  1 mM durante 30 min. La viabilidad celular se expresa como reducción de MTT en % respecto al control de células sin tratar (100% de viabilidad). Los resultados se expresan como media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$  versus control; #  $p < 0,05$  versus  $H_2O_2$ . Tóxico:  $H_2O_2$ .

Los extractos metanólicos de *Evernia prunastri* y *Cetraria islandica* son los que ejercen mayor efecto citoprotector frente al daño oxidativo en el modelo de astrogliá, aumentando la viabilidad en un 21% y un 20%, respectivamente, a la concentración de 10 µg/ml.

En este punto, y según los resultados mostrados en los ensayos de reducción de MTT (Figuras 24-25) se seleccionan las concentraciones que ejercen la mayor citoprotección frente al daño oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se selecciona una concentración por cada extracto y línea celular para proseguir con los estudios de morfología celular y ensayos de marcadores de EO. En las siguientes secciones, nos referiremos siempre a estas concentraciones, mostradas en la Tabla 13.

Tratamiento	Modelo celular SH-SY5Y	Incremento de viabilidad celular (vs H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Modelo celular U373-MG	Incremento de viabilidad celular (vs H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )
<i>Cetraria islandica</i>	0,5 µg/ml	18,86%	10 µg/ml	19,59%
<i>Cetrelia braunsiana</i>	0,5 µg/ml	16,22%	2,5 µg/ml	13,20%
<i>Evernia prunastri</i>	0,5 µg/ml	20,85%	10 µg/ml	20,95%
<i>Parmotrema saccatilobum</i>	0,25 µg/ml	10,51%	10 µg/ml	15,52%
<i>Usnea ghattensis</i>	0,5 µg/ml	13,42%	5 µg/ml	14,36%
<i>Vulpicida canadensis</i>	0,5 µg/ml	11,67%	25 µg/ml	16,57%

Tabla 13. Concentraciones seleccionadas por ejercer el mayor efecto citoprotector para cada extracto liquénico y modelo celular. Se muestra el incremento de viabilidad celular que ejerce cada pre-tratamiento respecto a las células tratadas sólo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (reducción en la viabilidad celular del 45% y 40% en células SH-SY5Y y U373-MG, respectivamente).

Para ejercer una protección efectiva frente al EO inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, las células SH-SY5Y requieren menores concentraciones de los extractos liquénicos que las células U373-MG. Esto demuestra la mayor sensibilidad del modelo de célula neuronal frente al de célula de astrogliá.

#### 1.2.4. Estudio de la morfología celular

El estudio de la capacidad citoprotectora de las muestras liquénicas se continúa mediante la evaluación, bajo un microscopio de contraste de fases, de los efectos de los pre-tratamientos con las concentraciones seleccionadas sobre la morfología celular. Las fotografías mostradas son imágenes representativas de cada uno de los tratamientos, utilizando una cámara Moticam 2500 acoplada al microscopio, y con un objetivo 10X.

### 1.2.4.1. Modelo celular SH-SY5Y

Como se observa en la Figura 26, las células SH-SY5Y adoptan una morfología poligonal o relativamente triangular con pequeñas prolongaciones (neuritas) mediante las cuales entran en contacto con células vecinas. Tienden a formar agrupaciones y no presentan excesiva adherencia a la placa de cultivo. Cuando se tratan con  $H_2O_2$  (0,1 mM, 30 min), las células reducen su número (consecuencia de la disminución de la viabilidad celular anteriormente demostrada), y presentan cambios en su morfología, adquiriendo formas más circulares y de menor tamaño con respecto a las células sin tratar; además, reducen su capacidad de formar agrupaciones.

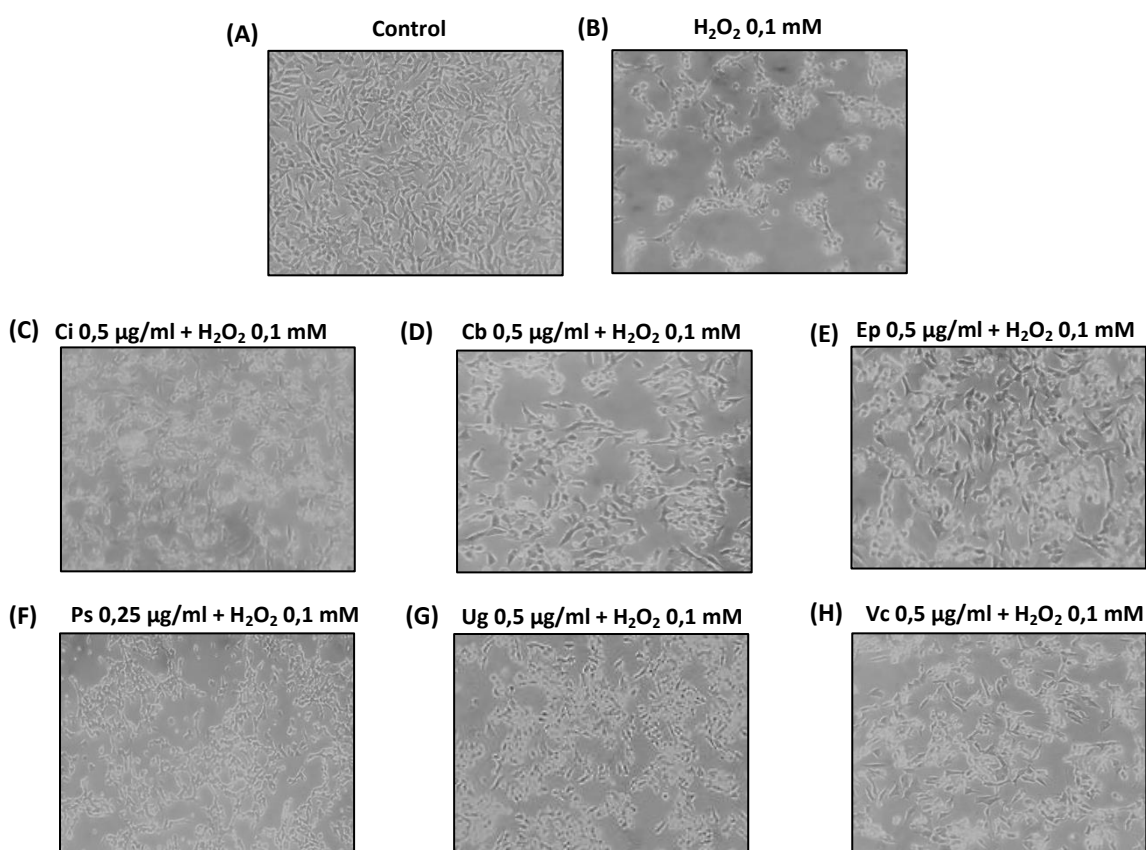


Figura 26. Efecto de los extractos líquénicos sobre la morfología de las células SH-SY5Y. Pre-incubación con los extractos metanólicos a las concentraciones indicadas (24 h) previo a la exposición a  $H_2O_2$  (0,1 mM, 30 min). Fotografías obtenidas para los distintos tratamientos: (A) células control, (B)  $H_2O_2$  0,1 mM, (C) *Cetraria islandica* +  $H_2O_2$  0,1 mM, (D) *Cetrelia braunsiana* +  $H_2O_2$  0,1 mM, (E) *Evernia prunastri* +  $H_2O_2$  0,1 mM, (F) *Parmotrema saccatilobum* +  $H_2O_2$  0,1 mM, (G) *Usnea ghattensis* +  $H_2O_2$  0,1 mM, (H) *Vulpicida canadensis*  $H_2O_2$  0,1 mM.

Sin embargo, el pre-tratamiento durante 24 h (previo a la inducción de daño oxidativo) con los extractos metanólicos, a las concentraciones que se han demostrado no-citotóxicas y con efecto citoprotector óptimo, atenúa significativamente los daños morfológicos y los cambios en el número de células SH-SY5Y. El efecto protector es especialmente destacable para los extractos Ep y Ci.

#### 1.2.4.2. Modelo celular U373-MG

Las células de la línea U373-MG tienen un mayor tamaño que las células SH-SY5Y. En condiciones normales de cultivo (células control), presentan una morfología estrellada con diversas prolongaciones que parten de un núcleo central. Al someterse al efecto del  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM, 30 min), las células U373-MG también sufren cambios morfológicos, disminuyendo su número y tamaño y viendo reducido el número de prolongaciones (Figura 27).

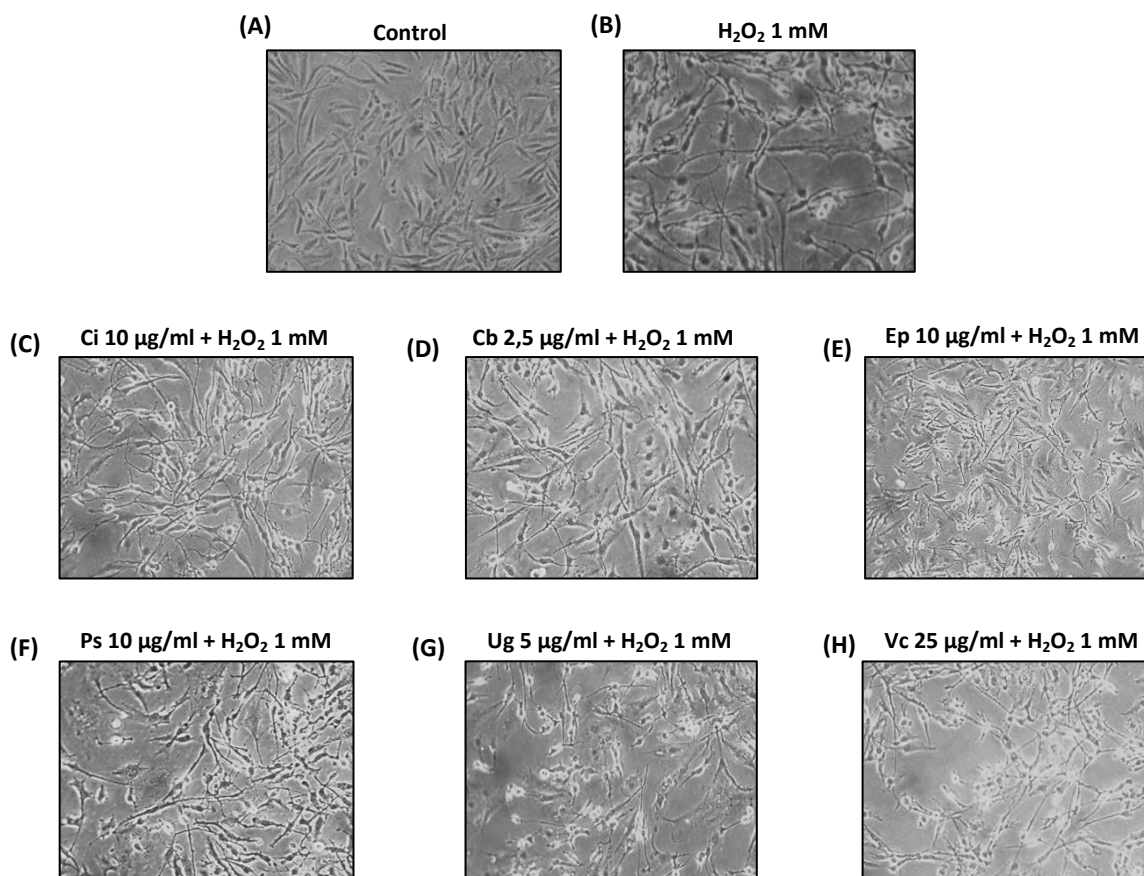


Figura 27. Efecto de los extractos líquénicos sobre la morfología de las células U373-MG. Pre-incubación con los extractos a las concentraciones indicadas (24 h) previo a la exposición a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM, 30 min). Fotografías obtenidas para los distintos tratamientos: (A) células control, (B)  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM, (C) *Cetraria islandica* +  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM, (D) *Cetrelia braunsiana* +  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM, (E) *Evernia prunastri* +  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM, (F) *Parmotrema saccatilobum* +  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM, (G) *Usnea ghattensis* +  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM, (H) *Vulpicida canadensis*  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM.

La pre-incubación de las células U373-MG con los extractos en estudio, previo a la exposición a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , minimiza la aparición de estos cambios. De forma semejante a lo observado para el modelo neuronal, los extractos de Ep y Ci son los que previenen en mayor grado los cambios estructurales y de poblaciones celulares.

## 1.2.5. Marcadores de estrés oxidativo

### 1.2.5.1. Generación intracelular de ERO

Se utiliza el ensayo de la diclorofluoresceína (DCFH-DA) para evaluar los niveles de ERO intracelulares. Cuanto mayor es la producción de ERO, mayor es el grado de estrés oxidativo celular, que representa uno de los principales factores implicados en la muerte celular en enfermedades neurodegenerativas. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es la ERO más abundante en el organismo, si bien su principal papel en la generación de EO se debe a que es fuente de nuevas ERO, muchas de las cuales (como el radical hidroxilo) ejercen efectos muy nocivos sobre biomoléculas. Se evalúan los efectos de los tratamientos en estudio sobre el nivel de ERO en los dos modelos celulares de neurona y astrocito.

#### 1.2.5.1.1. Modelo celular SH-SY5Y

En la Figura 28A, se observa que ninguno de los tratamientos con los extractos en estudio genera por sí mismo un aumento de la concentración intracelular de ERO respecto a los niveles de ERO basales en esta línea celular (100% en células control). Esto sugiere que los componentes de los extractos no inducen EO ni tampoco reaccionan con compuestos del medio de cultivo favoreciendo la formación de ERO (Halliwell, 2003).

Además, se recogen los resultados del tratamiento de las células SH-SY5Y con  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,1 mM (30 min), observándose un aumento significativo de los niveles de ERO intracelulares y dependiente del tiempo, en comparación con las células control (100% de generación de ERO). Las células tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  presentan niveles de ERO en torno al 130% (al finalizar el ensayo), confirmando la inducción de EO por una exposición a  $\text{H}_2\text{O}_2$  exógeno. Se utiliza un pre-tratamiento de las células con trolox (0,01 mM, 24 h) como compuesto antioxidante de referencia capaz de reducir el nivel de ERO en situaciones de EO (Figura 28B).

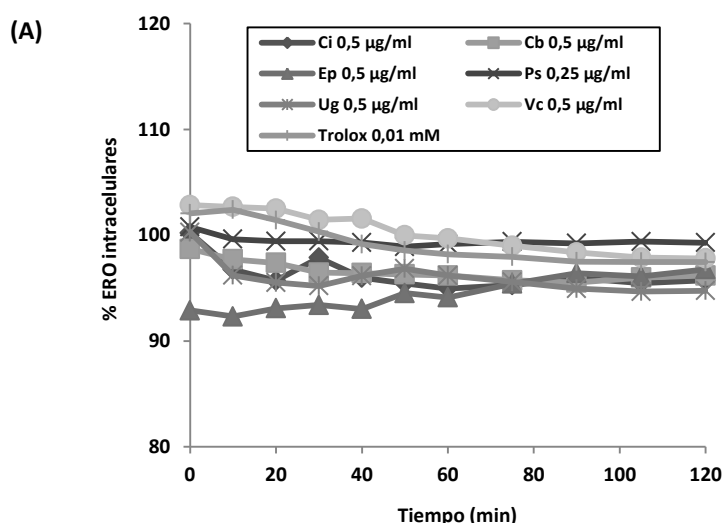


Figura 28. Efectos sobre la producción de ERO intracelulares. *Continúa en la siguiente página.*

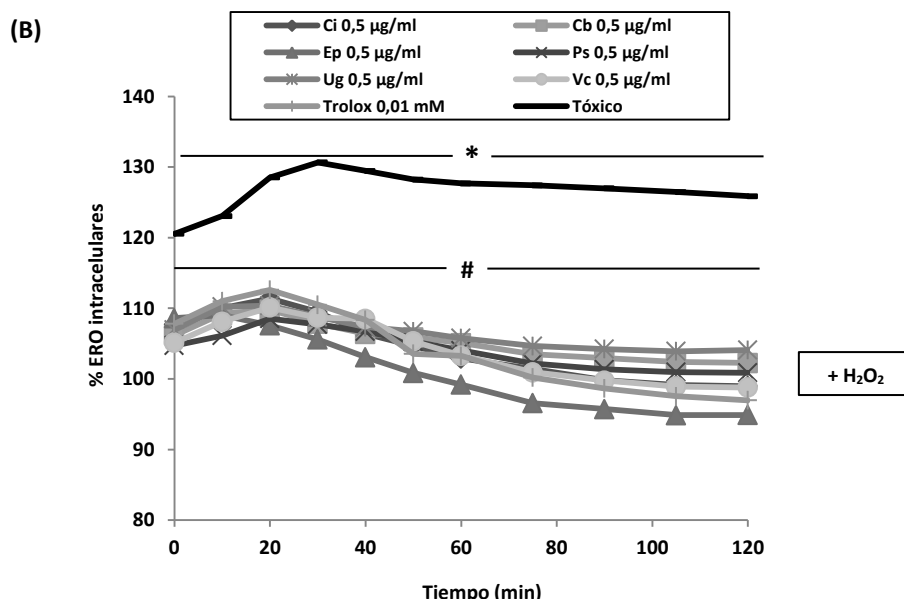


Figura 28. Efectos sobre la producción de ERO intracelulares. (A) Las células SH-SY5Y se tratan con los extractos líquénicos a las concentraciones óptimas seleccionadas. (B) Las células SH-SY5Y se pre-tratan con los extractos (24 h) y luego se exponen al efecto del  $H_2O_2$  (0,1 mM, 30 min). La producción intracelular de ERO se mide durante 2 h, y los resultados se expresan como % ERO respecto al control (100%). \*  $p < 0,05$  versus control; #  $p < 0,05$  versus  $H_2O_2$ . Tóxico:  $H_2O_2$ .

El pre-tratamiento con todos los extractos en estudio es capaz de revertir el incremento en los niveles de ERO que genera el  $H_2O_2$ , de forma estadísticamente significativa. El pre-tratamiento con el extracto de *Evernia prunastri* (0,5 µg/ml) resulta ser el más efectivo, y los niveles intracelulares de ERO en las células pre-tratadas con Ep son incluso menores que en las células control al terminar el experimento. Éstos resultados sugieren que el efecto citoprotector de los extractos frente al daño oxidativo observado en el modelo celular SH-SY5Y puede deberse, al menos en parte, a su efecto a nivel de la sobre-producción de ERO, evitando el daño que ello conlleva.

#### 1.2.5.1.2. Modelo celular U373-MG

El efecto de los tratamientos solo con los extractos (a las concentraciones correspondientes) tampoco genera un exceso de producción de ERO en las células U373-MG, siendo los niveles encontrados muy similares a los que presentan las células control (Figura 29A). De forma similar al caso anterior, la exposición de estas células al  $H_2O_2$  (1 mM) ejerce una inducción de EO y aumenta significativamente los niveles de ERO durante toda la duración del ensayo, hasta valores en torno al 30% superiores a los presentes en células control (100% de generación de ERO) (Figura 29B).

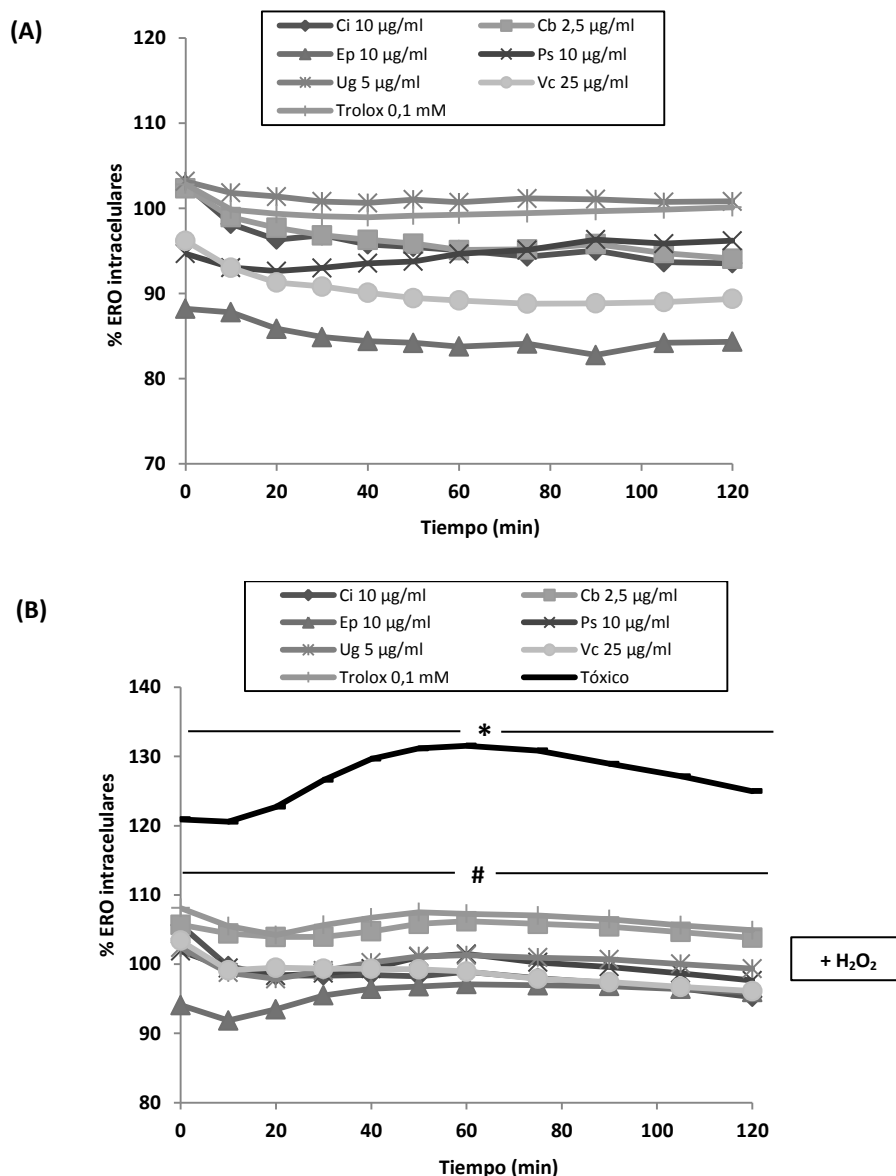


Figura 29. Efectos sobre la producción de ERO intracelulares. (A) Las células U373-MG se tratan con los extractos líquénicos a las concentraciones óptimas seleccionadas. (B) Las células U373-MG se pre-tratan con los extractos (24 h) y luego se exponen al efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM, 30 min). La producción intracelular de ERO se mide durante 2 h, y los resultados se expresan como % ERO respecto al control (100%). \*  $p < 0,05$  versus control; #  $p < 0,05$  versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tóxico: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

En la figura anterior, se observa que el tratamiento con los extractos, previo a la exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, reduce de forma significativa la generación intracelular de ERO; sus efectos son comparables al efecto del pre-tratamiento con trolox (0,1 mM, 24 h). Por tanto, se demuestra que el efecto de citoprotección ejercido por los extractos en la línea celular U373-MG también involucra una reducción del daño oxidativo mediado por las ERO.



### 1.2.5.2. Determinación de la peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica es uno de los principales mecanismos de daño oxidativo a biomoléculas provocado por ERO. Para estimar el grado de peroxidación de los lípidos celulares bajo los distintos tratamientos, se han cuantificado los niveles de malondialdehído (MDA) como indicador y subproducto de dicho proceso, mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), según el método descrito en el punto 2.4.5.2.2. de Material y Métodos.

#### 1.2.5.2.1. Modelo celular SH-SY5Y

El tratamiento de las células SH-SY5Y con  $H_2O_2$  (0,1 mM, 30 min) provoca un incremento de la peroxidación lipídica, que se traduce en un aumento de más del doble en los niveles de MDA. Mientras que las células control presentan niveles basales de 10,8 nmoles MDA/mg de proteína, en las células tratadas con  $H_2O_2$  se cuantifican hasta 23,2 nmoles MDA/mg de proteína. Por otro lado, el tratamiento (24 h) de las células únicamente con los extractos metanólicos no genera ninguna variación significativa del grado de peroxidación lipídica, sino que se obtienen niveles de MDA similares a los presentes en células control.

Los resultados demuestran también que el pre-tratamiento con los extractos (previo a la inducción de EO con  $H_2O_2$ ) es capaz de proteger frente al aumento de peroxidación lipídica, atenuando de forma significativa el incremento en los niveles de MDA, con excepción del extracto metanólico de Cb (Figura 30). El tratamiento más efectivo es el de Ci, que revierte totalmente el efecto del  $H_2O_2$  (niveles de MDA: 10,9 nmoles/mg proteína), seguido de Ep (11,4 nmoles/mg proteína). Los pre-tratamientos con Ci, Ep y Ug ejercen, incluso, un mayor efecto anti-peroxidativo que el trolox (0,01 mM, 24h), usado como antioxidante de referencia.

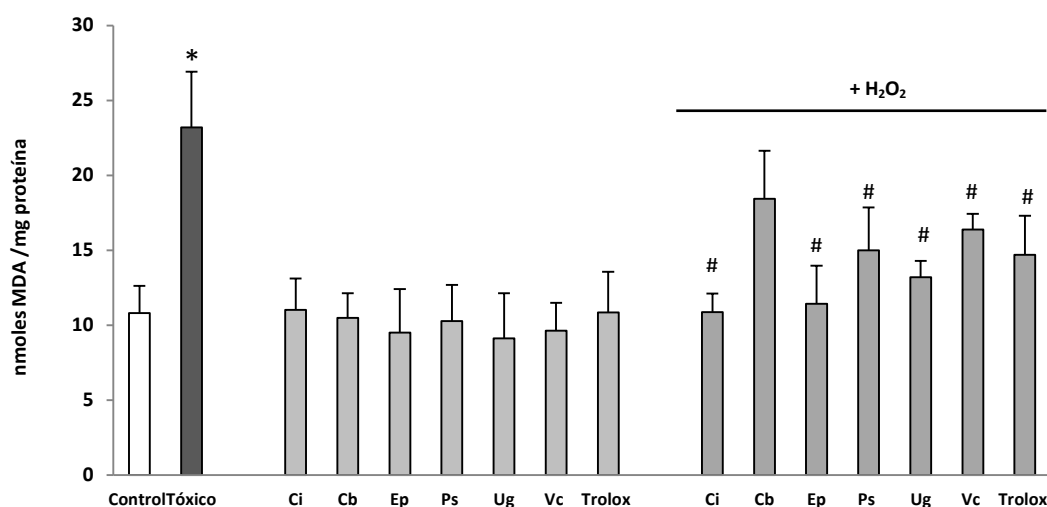


Figura 30. Cuantificación de los niveles de MDA. Las células SH-SY5Y se incuban con los extractos (concentraciones seleccionadas, 24 h) y/o con exposición posterior a  $H_2O_2$  (0,1 mM, 30 min). Los niveles de MDA se expresan como nmoles/mg proteína, y como media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$  versus control; #  $p < 0,05$  versus  $H_2O_2$ . Tóxico:  $H_2O_2$ .

### 1.2.5.2.2. Modelo celular U373-MG

Las células U373-MG demuestran una mayor resistencia a la peroxidación lipídica, y se encuentran menores niveles de MDA en las células control sin tratar (2,0 nmoles MDA/mg proteína). Sin embargo, la exposición a  $H_2O_2$  (1 mM, 30 min) ejerce un daño oxidativo a las biomoléculas, que supone un aumento en la peroxidación lipídica y se expresa en un aumento de los niveles de MDA hasta 5,6 nmoles/mg proteína.

El tratamiento de las células U373-MG con los extractos a las concentraciones óptimas seleccionadas (24 h) no ejerce por sí solo un aumento significativo en los niveles de MDA, en comparación con las células control. En cambio, cuando es anterior a la exposición a  $H_2O_2$ , ese tratamiento sí es capaz de atenuar significativamente la elevación de los niveles de MDA. Todos los extractos son efectivos para revertir la peroxidación lipídica debida a  $H_2O_2$  en las células U373-MG, pero cabe destacar el efecto antioxidante ejercido por los extractos de Ci (2,3 nmoles/mg proteína), Ep (3,1 nmoles/mg proteína) y Ug (3,5 nmoles/mg proteína) que, en ese orden, ejercen una protección frente a la peroxidación lipídica superior a la demostrada por el trolox (1 mM, 24 h) (Figura 31).

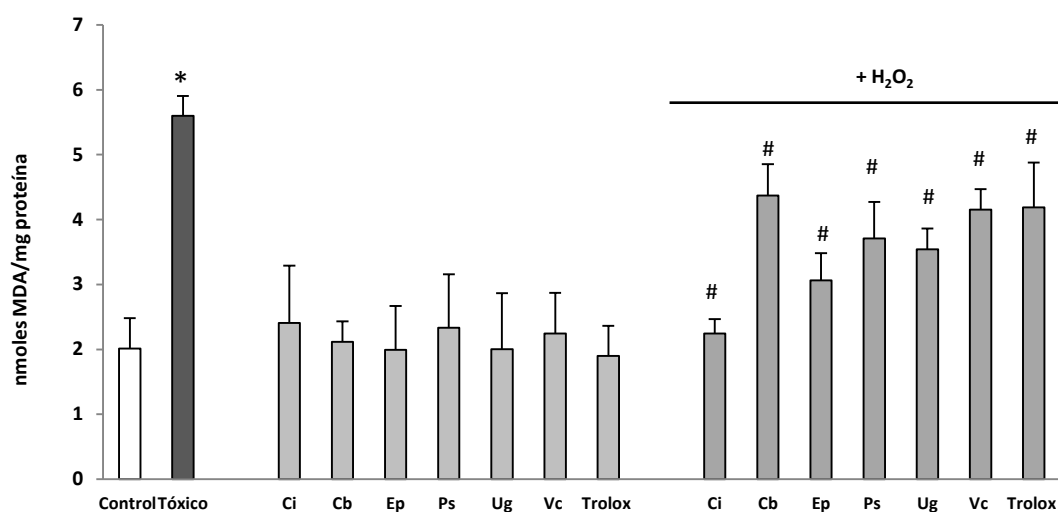


Figura 31. Cuantificación de los niveles de MDA. Las células U373-MG se incuban con los extractos (concentraciones seleccionadas, 24 h) y/o con exposición posterior a  $H_2O_2$  (1 mM, 30 min). Los niveles de MDA se expresan como nmoles/mg proteína, y como media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$  versus control; #  $p < 0,05$  versus  $H_2O_2$ . Tóxico:  $H_2O_2$ .

### 1.2.5.3. Glutación reducido y oxidado

El glutación reducido (GSH) constituye el principal sistema antioxidante endógeno no enzimático de las células del organismo. El efecto sobre el mismo de los extractos de líquenes parmeliáceos se ha determinado por fluorimetría. Se cuantifican los niveles de la forma activa GSH y de la forma oxidada GSSG, con el fin de evaluar posibles desequilibrios entre ambas que puedan afectar al estado redox intracelular. Los resultados se expresan en forma de índice redox GSH/GSSG.

#### 1.2.5.3.1. Modelo celular SH-SY5Y

Como se muestra en la Figura 32, las células control presentan mayores niveles de GSH (9,5 mmoles/mg proteína) que de GSSG (2,1 mmoles/mg proteína), lo que se traduce en un ratio GSH/GSSG de 4,5. Esto indica que, en condiciones basales, las células SH-SY5Y presentan un potencial antioxidante elevado debido al GSH. Los tratamientos con los extractos líquénicos no ejercen por sí solos un efecto significativo sobre el estado redox de las células, sin modificar significativamente las concentraciones de GSH ni GSSH, y manteniéndose, por tanto, valores similares de índice redox.

Por otro lado, la exposición a  $H_2O_2$  (0,1 mM, 30 min) demuestra un efecto nocivo sobre el potencial antioxidante celular, provocando una reducción significativa del GSH y un aumento de los niveles de GSSG (situándose en niveles similares al GSH), que se traducen en una drástica reducción del ratio GSH/GSSG (valor de 1,1). En cambio, si las células se pre-tratan con los extractos líquénicos (24 h) previamente a la inducción de EO, se observa que, bajo algunos tratamientos, se atenúan los cambios del sistema glutación. Así, los pre-tratamientos con Ep (ratio GSH/GSSG: 3,8), Ci (ratio GSH/GSSG: 3,0) y Ug (ratio GSH/GSSG: 2,8) revierten de forma significativa los efectos del EO sobre el sistema glutación.

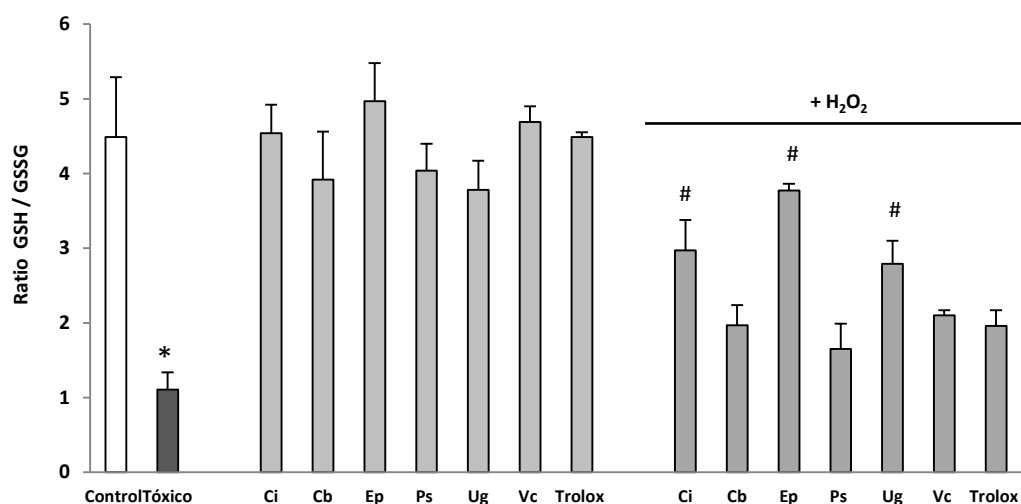


Figura 32. Efectos sobre los niveles del sistema antioxidante glutación. Las células SH-SY5Y se incuban con los extractos (concentraciones óptimas seleccionadas, 24 h) y/o con exposición posterior a  $H_2O_2$  (0,1 mM, 30 min). Los resultados se expresan como índice redox GSH/GSSG, y como media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$  versus control; #  $p < 0,05$  versus  $H_2O_2$ . Tóxico:  $H_2O_2$ .

### 1.2.5.3.2. Modelo celular U373-MG

Las células U373-MG control presentan una mayor diferencia entre los contenidos de GSH y GSSG, que se refleja en mayores niveles del índice GSH/GSSG respecto a las células SH-SY5Y (11,7 frente a 4,5). La mayor concentración de GSH respecto a la de GSSG se ve comprometida con la exposición de las células U373-MG a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM, 30 min), que induce daño oxidativo y afecta al estado redox del sistema glutatión, aumentando los niveles de GSSG. Así, en células expuestas a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el índice redox GSH/GSSG disminuye hasta un valor de 5,9.

Sin embargo, en las células U373-MG pre-tratadas con algunos de los extractos metanólicos en estudio (concentraciones seleccionadas, 24 h), previo a la incubación con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , se demuestra una atenuación significativa de los cambios en los niveles de GSH y GSSG inducidos por el EO. Al igual que en el modelo celular SH-SY5Y, los resultados de un índice redox más alto (implica una menor cantidad de GSSG) se obtienen con el extracto de Ep (ratio GSH/GSSG: 10,1), que revierte casi totalmente la alteración en las concentraciones de GSH y GSSG en células U373-MG (Figura 33).

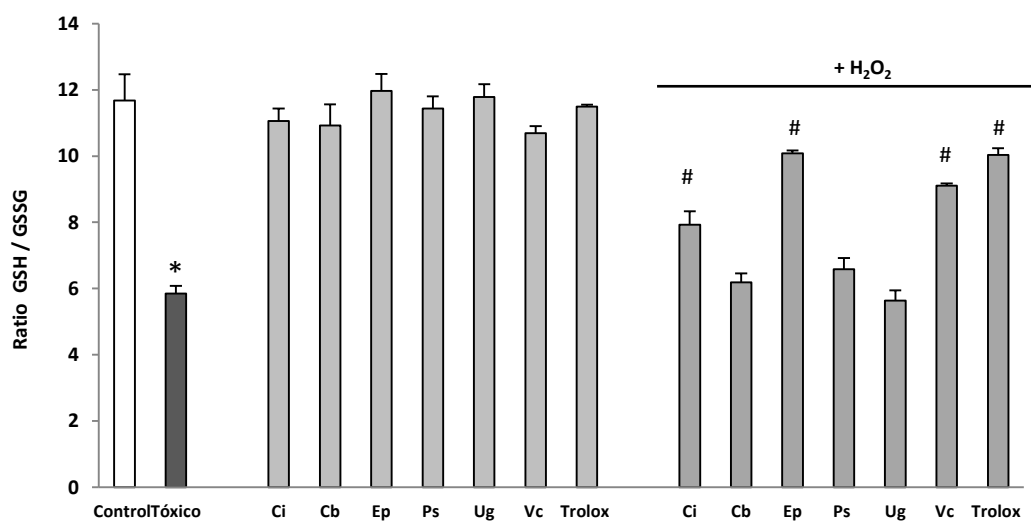


Figura 33. Efectos sobre los niveles del sistema antioxidante glutatión. Las células U373-MG se incuban con los extractos (concentraciones óptimas seleccionadas, 24 h) y/o con exposición posterior a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM, 30 min). Los resultados se expresan como índice redox GSH/GSSG, y como media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$  versus control; #  $p < 0,05$  versus  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Tóxico:  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### 1.3. Potencial anticancerígeno

Además de la actividad citoprotectora frente al daño oxidativo en modelos celulares de SNC, hemos realizado una aproximación al estudio del potencial anticancerígeno de los extractos metanólicos de los líquenes parmeliáceos. Para ello, se ha determinado su capacidad de ejercer citotoxicidad y disminuir la viabilidad celular en dos líneas celulares derivadas de tumores humanos: HepG2 (de carcinoma hepatocelular) y MCF-7 (adenocarcinoma de mama). Se ha empleado nuevamente el ensayo de reducción de MTT (apartado 2.4.6. Material y Métodos), para evaluar el efecto de un amplio rango de concentraciones (0,25 - 250 µg/ml).

Los resultados de viabilidad celular, expresados como porcentajes respecto a las células control (100% de viabilidad) se muestran en la Figura 34. La gráfica superior (Figura 34A) muestra los datos de viabilidad celular obtenidos para las células HepG2, y la inferior, (Figura 34B) aquellos obtenidos para las células MCF-7.

Las células HepG2 se muestran relativamente resistentes a la citotoxicidad ejercida por los extractos metanólicos, de manera que a concentraciones iguales o por debajo de 5 µg/ml ninguno de ellos ejerce citotoxicidad significativa. Cabe destacar los efectos de los extractos de Ug y Vc, que son capaces de reducir significativamente la proliferación de las células HepG2 a todas las concentraciones iguales o superiores a 10 µg/ml, llegando a ejercer una citotoxicidad similar a Tritón (viabilidad celular del 20%) en concentraciones de 100 µg/ml. El extracto que afecta en menor medida a la viabilidad celular de la línea HepG2 es el de Ps, seguido de Ep y Ci.

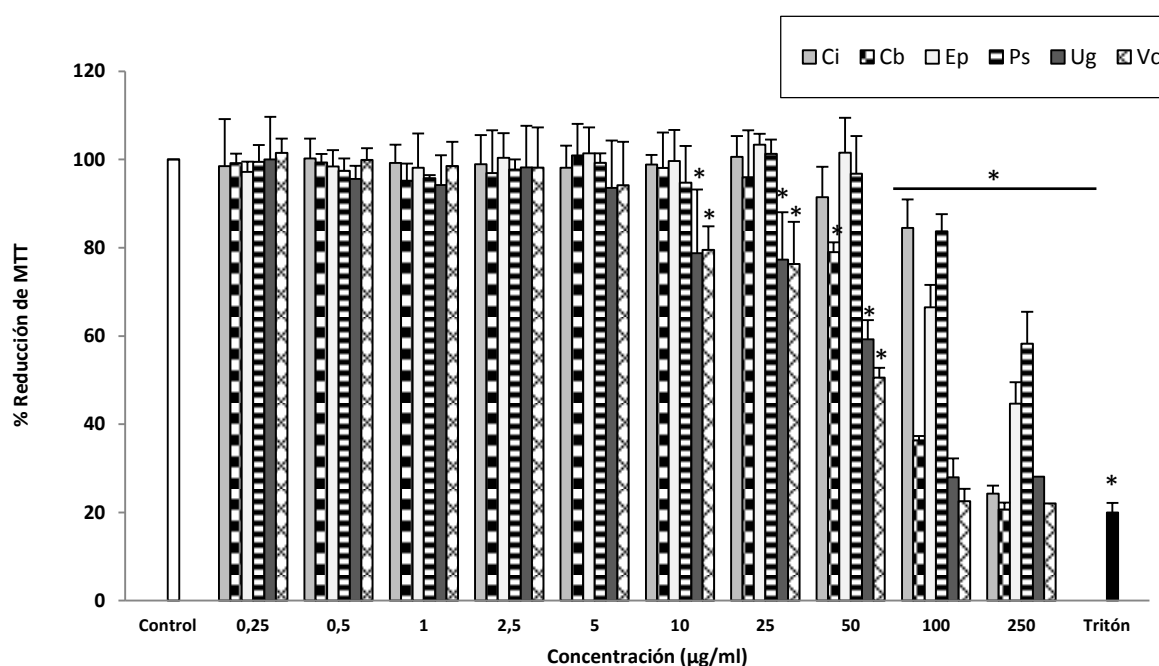


Figura 34. Resultados de viabilidad celular de las líneas celulares HepG2 (A) y MCF-7 (B).  
Continúa en la página siguiente.

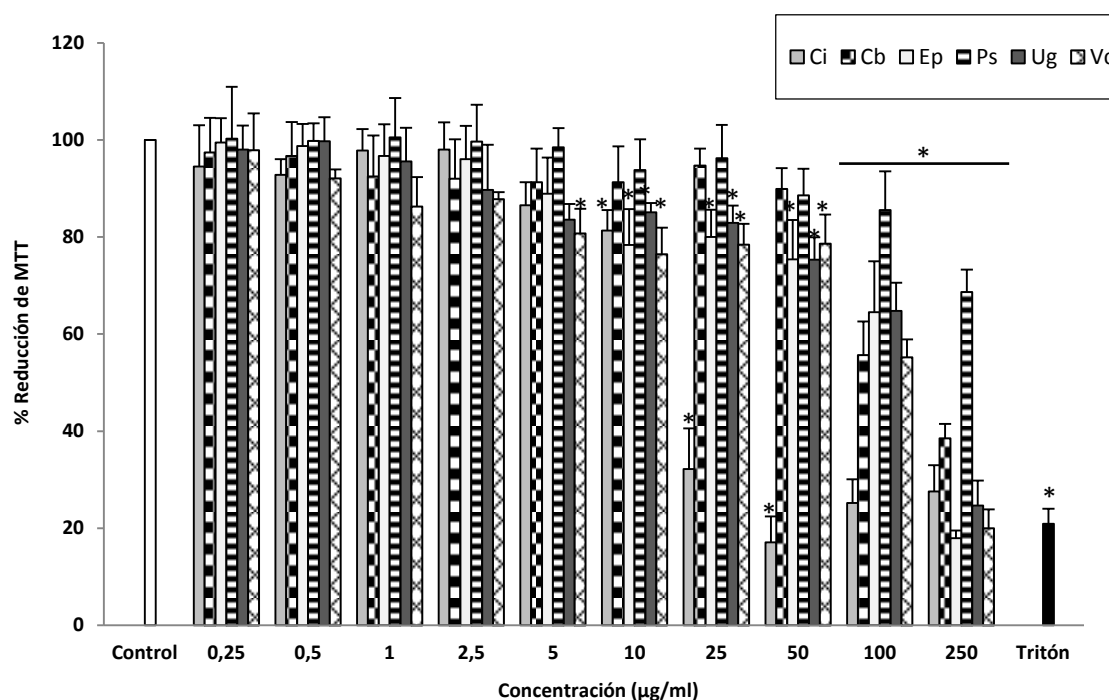


Figura 34. Resultados de viabilidad celular de las líneas celulares HepG2 (A) y MCF-7 (B). Las células se tratan con los seis extractos metanólicos durante 24 h. La reducción de MTT se expresa como % respecto al control (100% de viabilidad). Los resultados se expresan como media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$  versus control.

En general, los extractos metanólicos muestran una mayor citotoxicidad frente a las células MCF-7, e incluso, varios de ellos reducen significativamente la viabilidad celular a la concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$ . De los resultados obtenidos, cabe destacar el efecto citotóxico demostrado, además de por Ug y Vc, por el extracto metanólico de Ci. A la concentración de 25  $\mu\text{g/ml}$ , Ci reduce la viabilidad celular hasta el 33%, lo que supone un efecto significativamente superior al que este mismo tratamiento tiene sobre las células HepG2. El extracto que menos afecta a la viabilidad celular de la línea MCF-7 es nuevamente el de Ps.

En la Tabla 14, se muestran los valores de concentración letal 50 ( $\text{CL}_{50}$ , concentración a la cual se reduce la viabilidad celular al 50%, respecto a células control) para cada uno de los extractos y frente a cada línea celular.

Tratamiento (Especie)	Modelo celular HepG2	Modelo celular MCF-7
<i>Cetraria islandica</i> (Ci)	181,05 $\mu\text{g/ml}$	19,51 $\mu\text{g/ml}$
<i>Cetrelia braunsiana</i> (Cb)	89,31 $\mu\text{g/ml}$	169,16 $\mu\text{g/ml}$
<i>Evernia prunastri</i> (Ep)	200,64 $\mu\text{g/ml}$	156,97 $\mu\text{g/ml}$
<i>Parmotrema saccatilobum</i> (Ps)	361,01 $\mu\text{g/ml}$	487,46 $\mu\text{g/ml}$
<i>Usnea ghattensis</i> (Ug)	66,79 $\mu\text{g/ml}$	157,84 $\mu\text{g/ml}$
<i>Vulpicida canadensis</i> (Vc)	58,02 $\mu\text{g/ml}$	148,42 $\mu\text{g/ml}$

Tabla 14. Concentración letal 50 ( $\text{CL}_{50}$ ) obtenida para cada extracto y cada modelo celular.

## 2. ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS LIQUÉNICOS

### 2.1. Caracterización química de los extractos metanólicos

La composición química de los extractos metanólicos de las seis especies se estudia por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) bajo las condiciones experimentales descritas en el apartado 2.1. de Material y Métodos. Los cromatogramas obtenidos para cada extracto se muestran en la Figura 35.

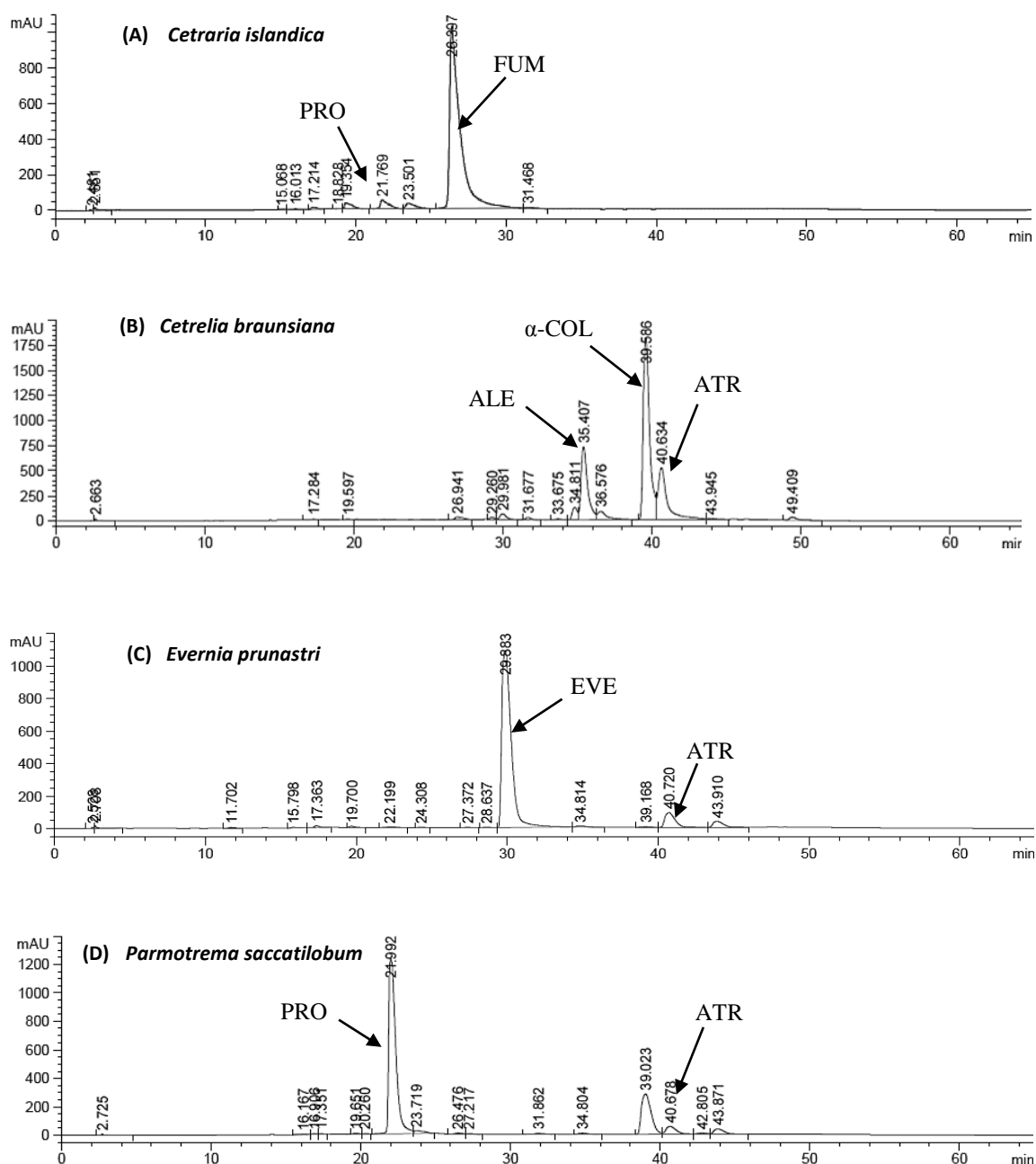


Figura 35. Cromatogramas adquiridos a 254 nm para los seis extractos metanólicos e identificación de sus componentes mayoritarios. *Continúa en la siguiente página.*

ALE: ácido alectorónico, ATR: atranorina,  $\alpha$ -COL: ácido  $\alpha$ -colatólico, EVE: ácido evérico, FUM: ácido fumarprotocetrárico; PRO: ácido protocetrárico.

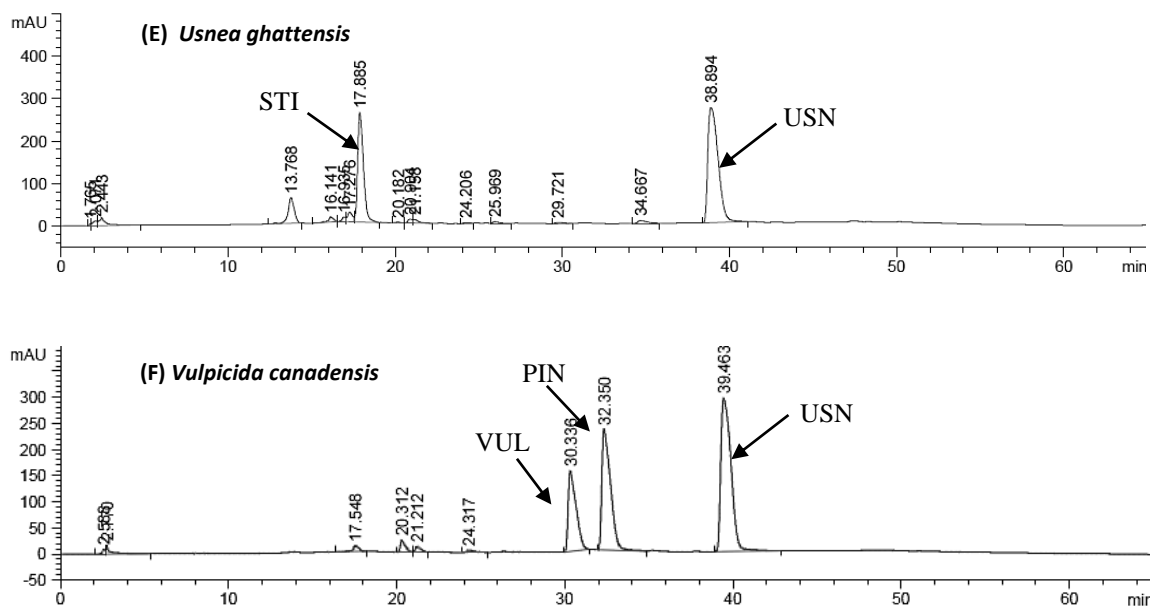


Figura 35. Cromatogramas adquiridos a 254 nm para los seis extractos metanólicos e identificación de sus componentes mayoritarios.

STI: ácido estíctico, USN: ácido úsnico, PIN: ácido pinástrico, VUL: ácido vulpínico.

La identificación inicial de los principales picos se lleva a cabo mediante la comparación de sus tiempos de retención con los de los compuestos puros (y extractos de otros líquenes de composición conocida) usados como patrones. La posible identidad de los constituyentes se estudia, además, mediante la comparación de los datos espectroscópicos (del espectro en el UV) de los picos con aquellos datos disponibles en la literatura (Yoshimura y col., 1994b).

La composición química que se ha estimado para los extractos se detalla a continuación. El extracto metanólico de *Cetraria islandica* (Ci) está constituido por ácido fumarprotocetrárico (depsidona) mayoritariamente (en torno al 90%) y contiene trazas de ácido protocetrárico (depsida). El extracto metanólico de *Cetrelia braunsiana* (Cb) presenta como principales metabolitos secundarios a los ácidos alectorónico y  $\alpha$ -colatólico (depsidonas), además de un pequeño contenido en atranorina (depsida). *Evernia prunastri* (Ep) también contiene un metabolito secundario mayoritario, el ácido evérnico (depsida), y trazas de atranorina. En el extracto metanólico de *Parmotrema saccatilobum* (Ps) se identifica como compuesto mayoritario el ácido protocetrárico (depsidona) y como minoritario la atranorina. El extracto de *Usnea ghattensis* (Ug) contiene principalmente ácido úsnico (dibenzofurano), pero también ácido estíctico (depsidona) en proporción considerable. Por último, en el extracto metanólico de *Vulpicida canadensis* (Vc) se detectan los ácidos vulpínico, pinástrico (derivados del ácido pulvínico) y úsnico. Los datos de tiempos de retención y datos espectroscópicos de los principales picos en los cromatogramas se recogen en la Tabla 15.



Pico	Compuesto	Tiempo de retención (min)	Espectro UV – Máximos de absorción (nm)	Porcentaje
ALE	Ácido alectorónico	35,41 ± 0,10	214, 254, 316	18-22%
ATR	Atranorina	40,27 ± 0,40	210, 252, 320	19-21% en Cb, 6-8% en Ep y 7-15% en Ps
$\alpha$ -COL	Ácido alfa-colatólico	39,55 ± 0,20	214, 256, 316	42-49%
EVE	Ácido evérnico	29,88 ± 0,34	216, 270, 304	80-85%
FUM	Ácido fumarprotocetrárico	26,73 ± 0,35	212, 240, 318	88-90%
PIN	Ácido pinástrico	32,35 ± 0,01	202, 246, 394	30-33%
PRO	Ácido protocetrárico	21,93 ± 0,14	212, 244, 318	71-80% en Ps y 4-5% en Ci
STI	Ácido estíctico	17,88 ± 0,09	212, 308	24-28 %
USN	Ácido úsnico	39,04 ± 0,37	204, 232, 282	53-55% en Ug y 37-45% en Vc
VUL	Ácido vulpínico	30,34 ± 0,01	202, 234, 276, 354	18-24 %

Tabla 15. Tiempos de retención (media  $\pm$  DE) y datos del espectro UV de los picos identificados en los cromatogramas. Se muestran los porcentajes en que se presenta cada compuesto en su extracto correspondiente.

A la vista de los resultados obtenidos para los seis extractos en los distintos ensayos desarrollados de actividad antioxidante y citoprotección frente a EO (recogidos en el punto 1 de la presente sección), los extractos que ejercen unos efectos más prometedores son los correspondientes a *Evernia prunastri* y *Cetraria islandica*. Llegados a este punto, conocemos que ambos extractos presentan un metabolito secundario mayoritario (en torno al 85-90% del área integrada en sus cromatogramas), y cuyas probables identidades son: ácido evérnico y ácido fumarprotocetrárico, respectivamente. Por ello, se procede a aislar ambos compuestos de sus extractos correspondientes (según el procedimiento descrito en el apartado 2.1.4. de Material y Métodos), y a confirmar su identidad.

## 2.2. Aislamiento e identificación de los metabolitos

Una vez identificados los ácidos evérnico y fumarprotocetrárico como mayoritarios en sus respectivos extractos, y determinados sus tiempos de retención, se aíslan mediante un método de HPLC semi-preparativa (descrito en el apartado 2.1.4. de Material y Métodos). Se recogen, a dichos tiempos de retención, las fracciones correspondientes a un total de 20 inyecciones en el cromatógrafo, de manera que los compuestos se obtienen disueltos en una mezcla de agua/metanol. Se liofilizan las muestras y se pesa el residuo seco, que debe corresponderse a los compuestos aislados. Se obtienen un total de 8,3 mg de la extracción a partir del extracto de *E. prunastri* (debe corresponderse al ácido evérnico) y 9,7 mg a partir del correspondiente de *C. islandica* (ácido fumarprotocetrárico).

Tras el aislamiento, una parte de los compuestos aislados (residuo seco) se re-disuelve en metanol, y se analizan los datos espectroscópicos y tiempos de retención de dichos compuestos, comparando con aquéllos de los compuestos en los extractos. Se verifica que los tiempos de retención coinciden, así como los espectros UV, que son idénticos (Figura 36), lo cual indica a una alta pureza de los compuestos aislados. Además los máximos de absorbancia del espectro UV de los compuestos aislados coinciden con aquéllos publicados para ácido evérnico y ácido fumarprotocetrárico, respectivamente (Yoshimura y col., 1994b).

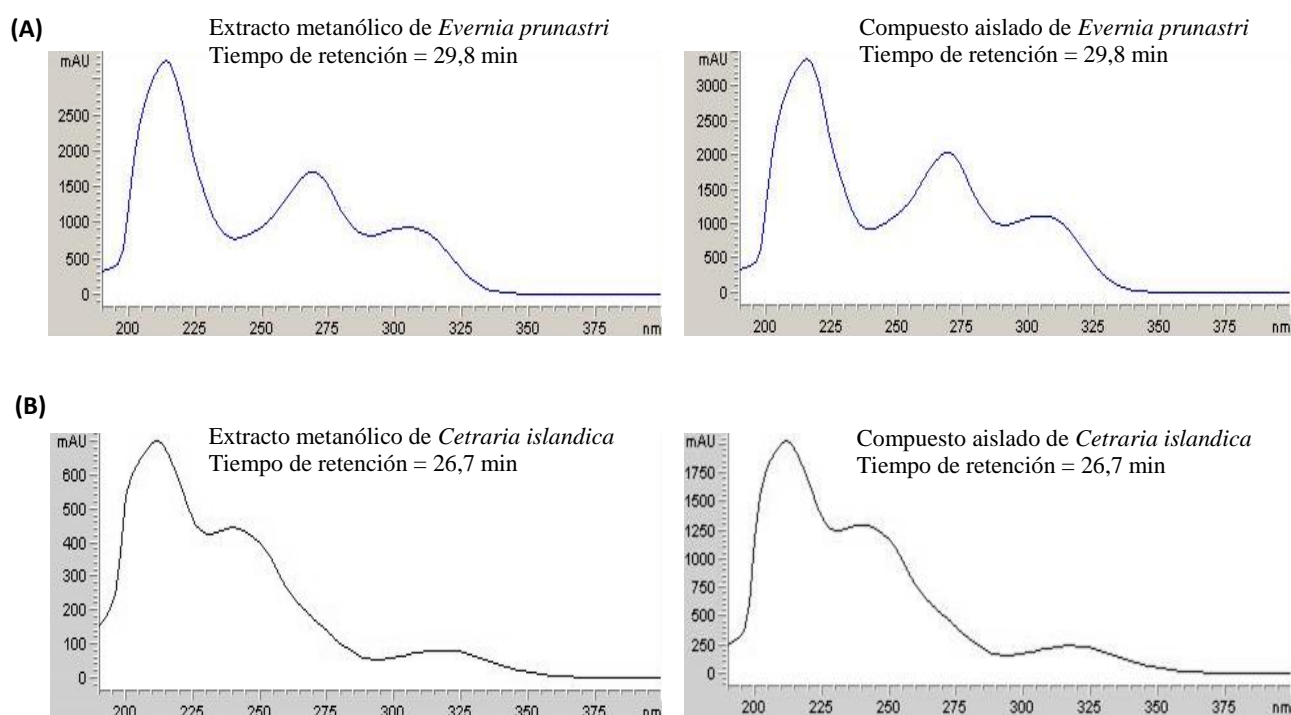


Figura 36. Espectros UV (190-400 nm) obtenidos para los picos mayoritarios en los cromatogramas de los extractos (izquierda), y para los compuestos aislados por HPLC semi-preparativa (derecha), de *Evernia prunastri* (A) y *Cetraria islandica* (B).

A fin de confirmar la identidad de los compuestos aislados, se obtienen sus espectros de RMN  $^1\text{H}$ . Para ello, una parte de los productos obtenidos tras la liofilización se disuelven en DMSO deuterado (DMSO- $d_6$ ). Los resultados obtenidos están en consonancia con aquellos previamente publicados en la literatura científica. Los datos espectroscópicos del compuesto aislado de *Evernia prunastri* coinciden con aquellos del ácido evérnico divulgados por Narui y colaboradores (1998) (Figura 37A); y los datos de RMN correspondientes al compuesto aislado de *Cetraria islandica* son idénticos a los publicados por Su y colaboradores (2003) para el ácido fumarprotocetrárico (Figura 37B).

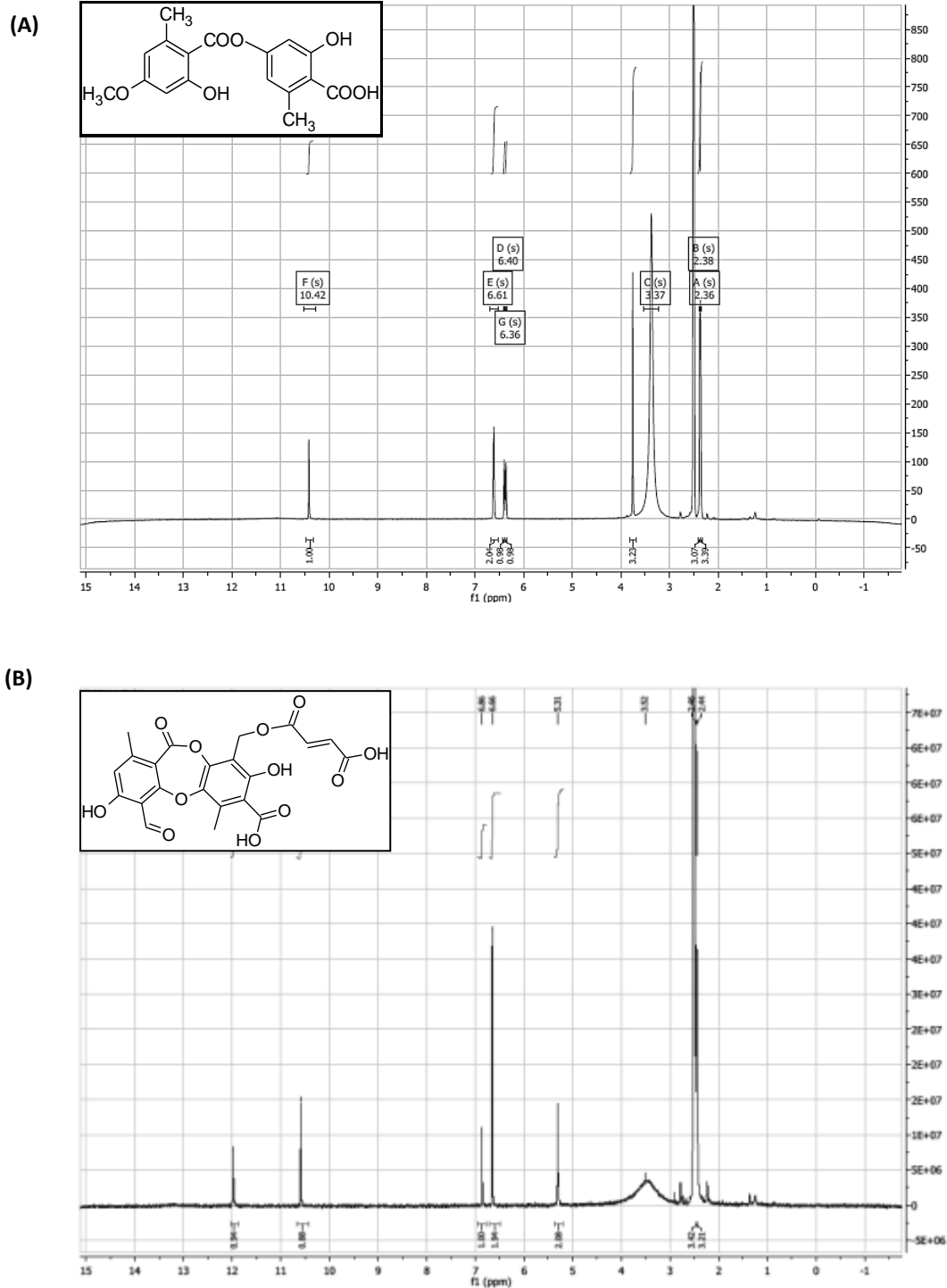


Figura 37. Espectros de RMN  $^1\text{H}$  obtenidos para los ácidos evérnico (A) y fumarprotocetrárico (B), previamente aislados de los respectivos extractos líquénicos por HPLC semipreparativa.

(A)  $^1\text{H}$ -RMN (250 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  2.44 (s, 3H), 2.46 (s, 3H), 3.52 (bs, 1H), 5.31 (s, 2H), 6.66 (s, 2H), 6.86 (s, 1H), 10.59 (s, 1H), 11.98 (s, 1H).

(B)  $^1\text{H}$ -RMN (250 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  2.36 (s, 3H), 2.38 (s, 3H), 3.37 (s, 3H), 6.36 (s, 1H), 6.40 (s, 1H), 6.61 (s, 2H), 10.42 (s, 1H).

### 3. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA DE METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE LÍQUENES PARMELIÁCEOS

Una vez aislados e identificados los componentes mayoritarios (ácido evérnico y ácido fumarprotocetrárico) de los extractos que han mostrado la mayor actividad, a partir de este punto se evalúan las actividades de los metabolitos secundarios aislados con el fin de abordar una aproximación al mecanismo de sus efectos neuroprotectores. Se investigarán las actividades de los dos compuestos aislados, así como de atranorina y ácido úsnico, que se seleccionan por ser compuestos muy comunes en diversas especies de líquenes de *Parmeliaceae* y por estar presente en más de un extracto de los evaluados en el presente trabajo (y que han demostrado actividad citoprotectora frente a estrés oxidativo en la fase inicial del trabajo).

Son cuatro ‘*sustancias líquénicas*’ que pertenecen al grupo de los poliquétidos y, por tanto, son sintetizados por la vía del acetato-polimalonato.

#### 3.1. Actividades antioxidante y neuroprotectora en un modelo celular de estrés oxidativo

##### 3.1.1. Capacidad de captación de radicales libres

Los compuestos con potencial antioxidante pueden interaccionar con las ERO para estabilizarlas y reducir el daño que éstas generan a nivel de biomoléculas (mecanismo de acción directo). En el presente trabajo se determina la actividad *scavenger* de radicales libres de los compuestos líquénicos mediante los ensayos de ORAC y DPPH.

La actividad *scavenger* de radicales peroxilo por parte de los metabolitos líquénicos en el ensayo de ORAC resulta superior a la que presenta el trolox como antioxidante de referencia, tal y como se refleja en una mayor atenuación de la caída de la fluorescencia debida a fluoresceína. En la Tabla 16 se muestran los valores ORAC (expresados como  $\mu\text{mol ET/mg}$  compuesto) de los cuatro poliquétidos investigados, que sigue un orden decreciente: ácido evérnico (EVE) > ácido fumarprotocetrárico (FUM) > ácido úsnico (USN) > atranorina (ATR). En general, los compuestos aislados EVE y FUM presentan una mayor potencia antioxidante que sus extractos de partida (ver resultados en Tabla 12).

La capacidad de captación del radical DPPH por parte de los compuestos en estudio no es tan potente como la anterior, siendo la actividad del trolox, en este ensayo, mayor que la de

los compuestos aislados. Al igual que en el ensayo de ORAC, EVE demuestra la mayor actividad *scavenger* frente a DPPH (representado por una menor IC<sub>50</sub>). Los valores de IC<sub>50</sub> de los cuatro compuestos se presentan en la siguiente Tabla 16.

Compuesto	Valor de ORAC ( $\mu$ moles ET/mg muestra)	DPPH IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)
Atranorina (ATR)	1,13 $\pm$ 0,16	1213,10
Ácido evérnico (EVE)	12,81 $\pm$ 0,84	762,21
Ácido fumarprotocetrárico (FUM)	5,07 $\pm$ 0,43	1393,83
Ácido úsnico (USN)	2,89 $\pm$ 0,11	798,71

Tabla 16. Resultados obtenidos para los metabolitos liquénicos en los ensayos de actividad captadora de RL.

### 3.1.2. Estudio de la viabilidad celular y citotoxicidad

Como paso previo a estudiar la actividad citoprotectora de los metabolitos liquénicos frente a EO, se determina el rango de concentraciones a las cuales éstos no ejercen efectos citotóxicos sobre las líneas celulares SH-SY5Y y U373-MG. Las Figuras 38-41 muestran todos los resultados de viabilidad celular obtenidos.

#### 3.1.2.1. Ensayo de reducción de MTT

##### 3.1.2.1.1. Modelo celular SH-SY5Y

Para evaluar la posible toxicidad *in vitro* de los metabolitos liquénicos sobre la línea celular SH-SY5Y, se tratan las células durante 24 h y a 37°C con un amplio rango de concentraciones de los compuestos (0,25 - 250  $\mu$ g/ml); posteriormente, se determina la reducción de MTT por espectrofotometría, como indicador de la actividad enzimática mitocondrial. Los resultados de viabilidad celular se expresan en porcentaje respecto a las células control sin tratar (100% viabilidad).

Se observa que los cuatro poliquétidos en estudio, a concentraciones superiores a 50  $\mu$ g/ml, comprometen significativamente la viabilidad de las células SH-SY5Y (efecto concentración-dependiente), mientras que por debajo de 25  $\mu$ g/ml son mayoritariamente no citotóxicos (valores de reducción de MTT en torno al 90% o superiores). El ácido úsnico es, sin embargo, una excepción, ya que ejerce una marcada citotoxicidad en concentraciones desde 5  $\mu$ g/ml (Figura 38).

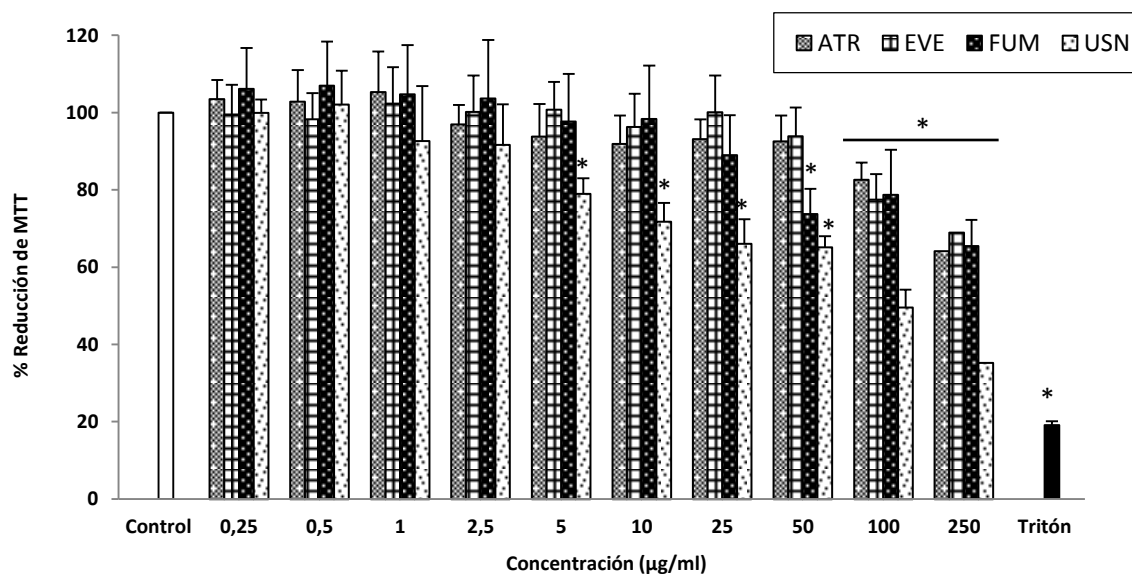


Figura 38. Resultados de viabilidad celular de la línea SH-SY5Y bajo los tratamientos (24 h) con los cuatro metabolitos líquénicos. La reducción de MTT se expresa como % respecto al control (100% de viabilidad). Los resultados se expresan como media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$  versus control.

### 3.1.2.1.2. Modelo celular U373-MG

Una vez evaluada la citotoxicidad de los metabolitos líquénicos sobre las células SH-SY5Y (modelo neuronal), se procede a evaluar sus efectos sobre el modelo de células de astrogliá, como células mayoritarias del SNC. Las células U373-MG (modelo de astrocitoma humano), bajo tratamientos de 24 h con los cuatro metabolitos líquénicos, muestran valores de reducción de MTT superiores al 90% en el rango de 0,25 a 25 µg/ml, indicando que no se altera la viabilidad celular, que es similar al control. Como en el caso anterior, sólo concentraciones comprendidas entre 50 y 250 µg/ml provocan citotoxicidad con muerte celular significativa. Incluso, sólo concentraciones de USN superiores a 25 µg/ml reducen la actividad enzimática mitocondrial y suponen una menor reducción de MTT. Los tratamientos con EVE y FUM resultan menos citotóxicos que en el caso de las células SH-SY5Y, y concentraciones de 50 y 100 µg/ml de ambos no ejercen una toxicidad celular significativa sobre esta línea celular. Los resultados, de forma general, indican que las células U373-MG se muestran menos susceptibles a la citotoxicidad ejercida por altas concentraciones de compuestos líquénicos. Se muestran todos los resultados de reducción de MTT en la Figura 39.

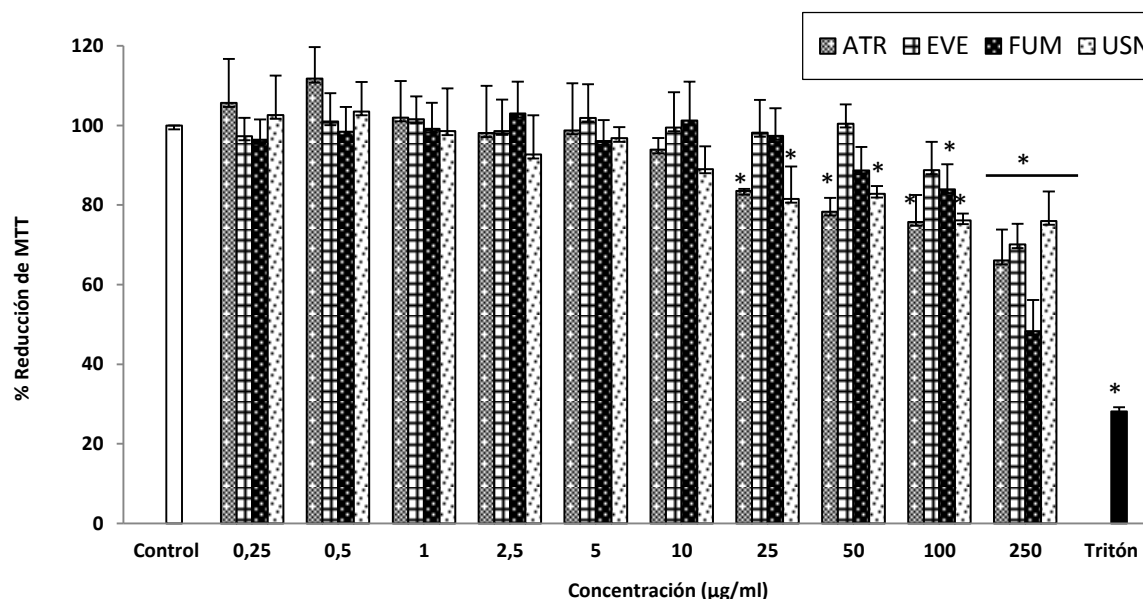


Figura 39. Resultados de viabilidad celular de la línea U373-MG bajo los tratamientos (24 h) con los cuatro metabolitos líquénicos. La reducción de MTT se expresa como % respecto al control (100% de viabilidad). Los resultados se expresan como media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$  versus control.

### 3.1.2.2. Ensayo de actividad LDH

La medida de la actividad enzimática de LDH liberada, como indicador de la integridad de la membrana plasmática, permite confirmar el rango de concentraciones en que los metabolitos líquénicos no comprometen la viabilidad celular.

#### 3.1.2.2.1. Modelo celular SH-SY5Y

Las células SH-SY5Y se tratan durante 24 h con cuatro concentraciones de cada uno de los compuestos en estudio en el rango de 5 a 100 µg/ml. De forma similar a lo que ocurría en el tratamiento con los extractos, las células SH-SY5Y sufren un efecto citotóxico concentración-dependiente con los compuestos líquénicos, que se refleja en un incremento significativo de la liberación de LDH al medio de cultivo cuando sus concentraciones superan los 50 µg/ml. En esos casos, la integridad de la membrana se ve muy afectada, en niveles similares a lo que ocurre con la exposición de las células al control negativo Tritón (liberación del 59% de enzima LDH respecto a la enzima total en la célula). En cambio, si los metabolitos líquénicos permanecen en el rango 5-10 µg/ml, los resultados de liberación de LDH son similares a los mostrados por las células control, indicando que no hay citotoxicidad reseñable (ver Figura 40). No existen diferencias significativas entre los efectos sobre la integridad de membrana de los tratamientos con los distintos compuestos a una misma concentración, salvo la menor

citotoxicidad mostrada por EVE. Esto se correlaciona con la menor actividad de la LDH liberada en células tratadas con el extracto de Ep (Figura 22), ya que es su principal metabolito.

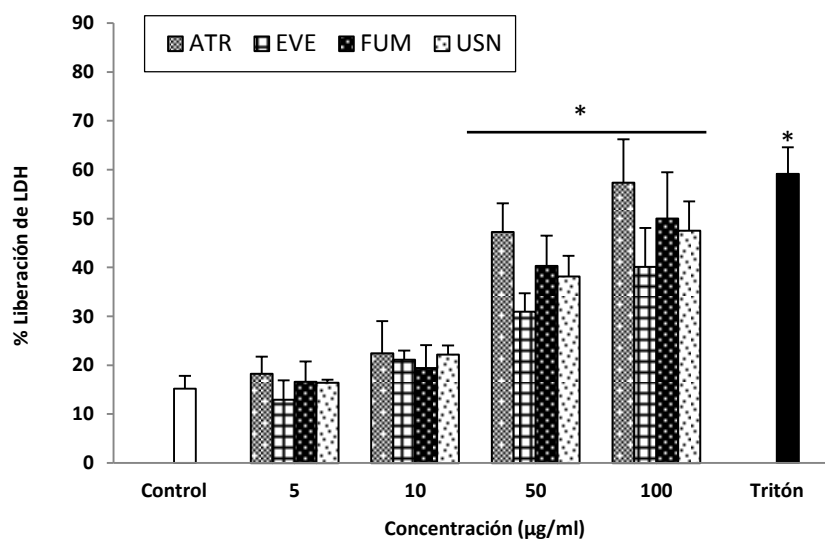


Figura 40. Resultados del ensayo de actividad LDH bajo los distintos tratamientos (24 h) con metabolitos liquénicos. La viabilidad celular de la línea SH-SY5Y se expresa como porcentaje de liberación de LDH del citoplasma al citosol, con respecto a la cantidad total de enzima. Los resultados se expresan como media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$  versus control.

### 3.1.2.2.2. Modelo celular U373-MG

En el ensayo de actividad LDH, los tratamientos con los compuestos aislados sobre las células U373-MG (rango 5-100 µg/ml) muestran resultados similares a los de las células SH-SY5Y respecto a afectación de membrana plasmática y liberación de enzima. Por tanto, se puede concluir que las concentraciones de 5 y 10 µg/ml no afectan a la integridad de la membrana plasmática, descartando las concentraciones de 50 µg/ml y superiores por ejercer una marcada citotoxicidad sobre esta línea celular (Figura 41).

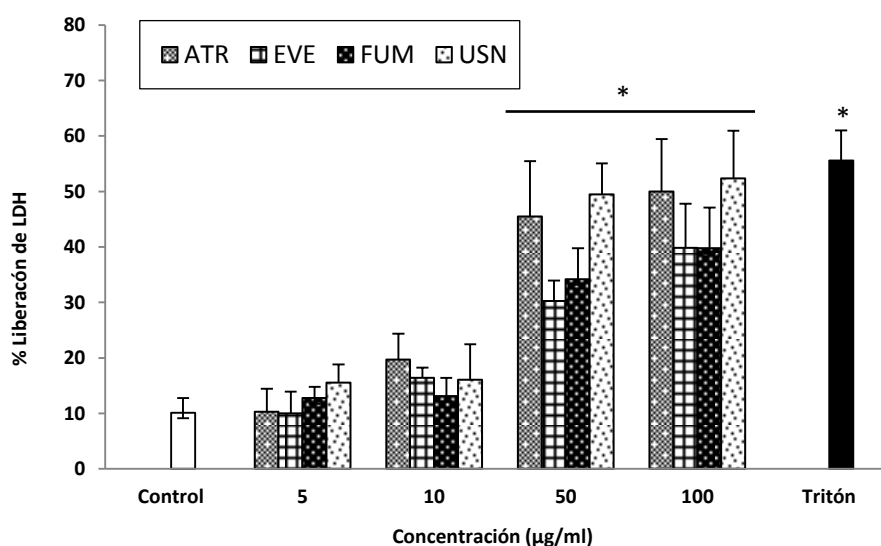


Figura 41. Resultados del ensayo de actividad LDH bajo los distintos tratamientos (24 h) con metabolitos liquénicos. La viabilidad celular de la línea U373-MG se expresa como porcentaje de liberación de LDH del citoplasma al citosol, con respecto a la cantidad total de enzima. Los resultados se expresan como media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$  versus control.



### 3.1.3. Estudio de la actividad citoprotectora frente al estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

El estudio del potencial neuroprotector de los compuestos liquénicos frente a situaciones de daño oxidativo se continúa con la selección de las concentraciones de cada uno de ellos que no afectan a la viabilidad celular de cada una de las líneas celulares (definidas en el apartado 3.1.2.1. de la presente sección). Por el ensayo de MTT, se evalúa su capacidad citoprotectora frente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 3.1.3.1. Ensayo de reducción de MTT

##### 3.1.3.1.1. Modelo celular SH-SY5Y

En relación al modelo celular de neuroblastoma, las células SH-SY5Y se tratan durante 24 h con las concentraciones de los metabolitos secundarios que no afectan a la viabilidad celular (Figura 38) y se exponen posteriormente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 mM, 30 min). Los resultados de reducción de MTT se recogen en la Figura 42.

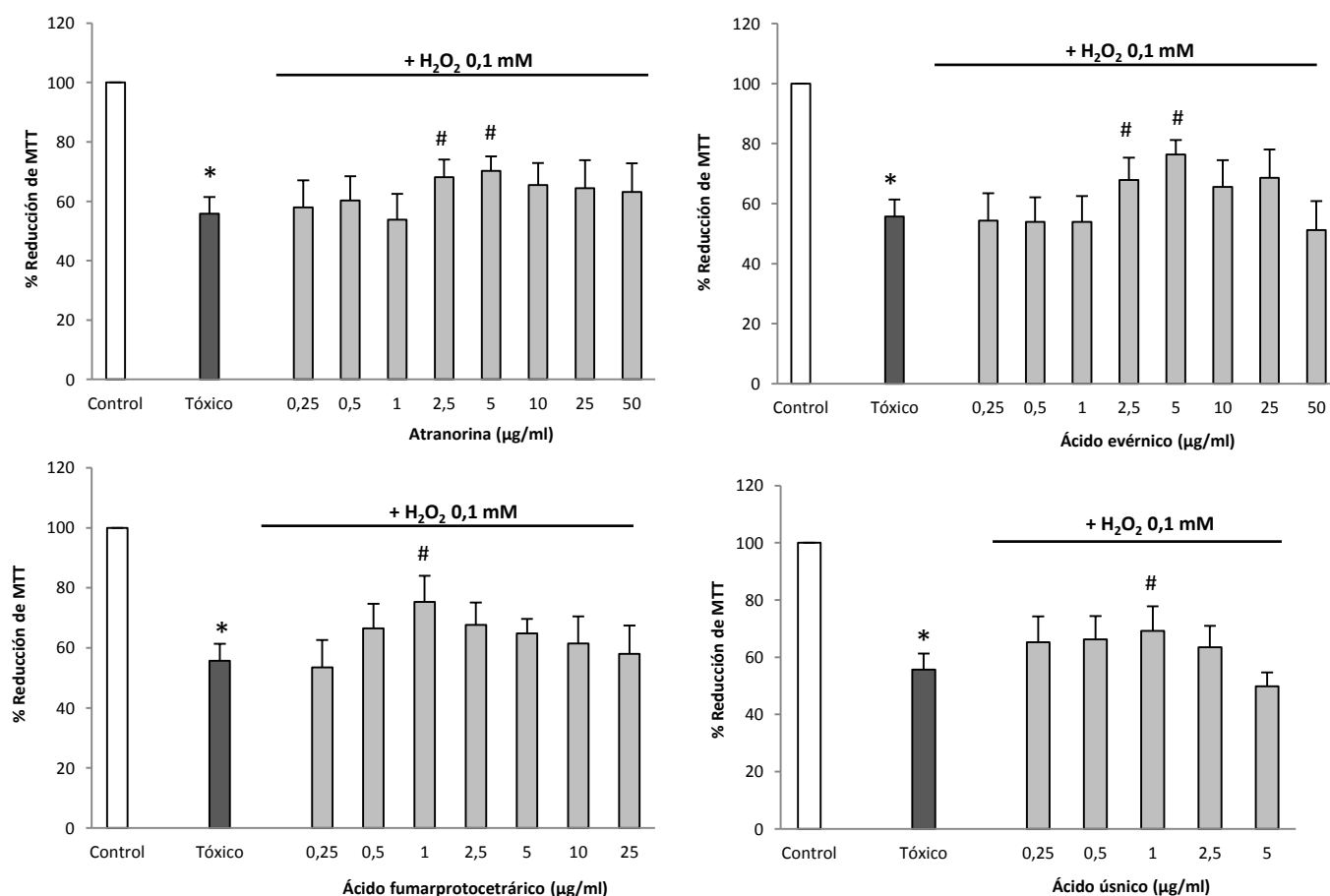


Figura 42. Efecto citoprotector de los metabolitos liquénicos frente al estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las células SH-SY5Y. Las células se pre-tratan con las concentraciones no citotóxicas de los compuestos (24 h) y se exponen luego a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,1 mM (30 min). La viabilidad celular se expresa como reducción de MTT en % respecto al control de células sin tratar (100% de viabilidad). Los resultados se expresan como media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$  versus control; #  $p < 0,05$  versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tóxico: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Los datos de viabilidad celular obtenidos demuestran que la pre-incubación de estas células con determinadas concentraciones de los metabolitos liquénicos ejerce un efecto citoprotector frente al estrés oxidativo generado por  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Los pre-tratamientos con ATR 2,5 y 5  $\mu\text{g/ml}$ , EVE 2,5 y 5  $\mu\text{g/ml}$ , FUM 1  $\mu\text{g/ml}$  y USN 1  $\mu\text{g/ml}$  son capaces de prevenir de forma significativa la reducción en la viabilidad celular que provoca el  $\text{H}_2\text{O}_2$  (reducción de un 45% respecto a la viabilidad de las células control). Cabe resaltar el efecto citoprotector de EVE (a 5  $\mu\text{g/ml}$ ) y de FUM (a 1  $\mu\text{g/ml}$ ) que incrementan la viabilidad celular de las células SH-SY5Y en un 22% y 20%, respectivamente, respecto a las células tratadas sólo con  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### 3.1.3.1.2. Modelo celular U373-MG

Un protocolo de pre-tratamientos similar al descrito en el apartado anterior se lleva a cabo sobre la línea celular U373-MG para evaluar el efecto citoprotector de las concentraciones que se han demostrado no citotóxicas en esta línea (Figura 39). En este caso, el modelo celular de estrés oxidativo implica la exposición (30 min) de las células a  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM, que demuestra ejercer citotoxicidad notable, reduciendo su viabilidad en un 40% respecto a las células sin tratar. Los resultados del ensayo de citoprotección se muestran en la Figura 43.

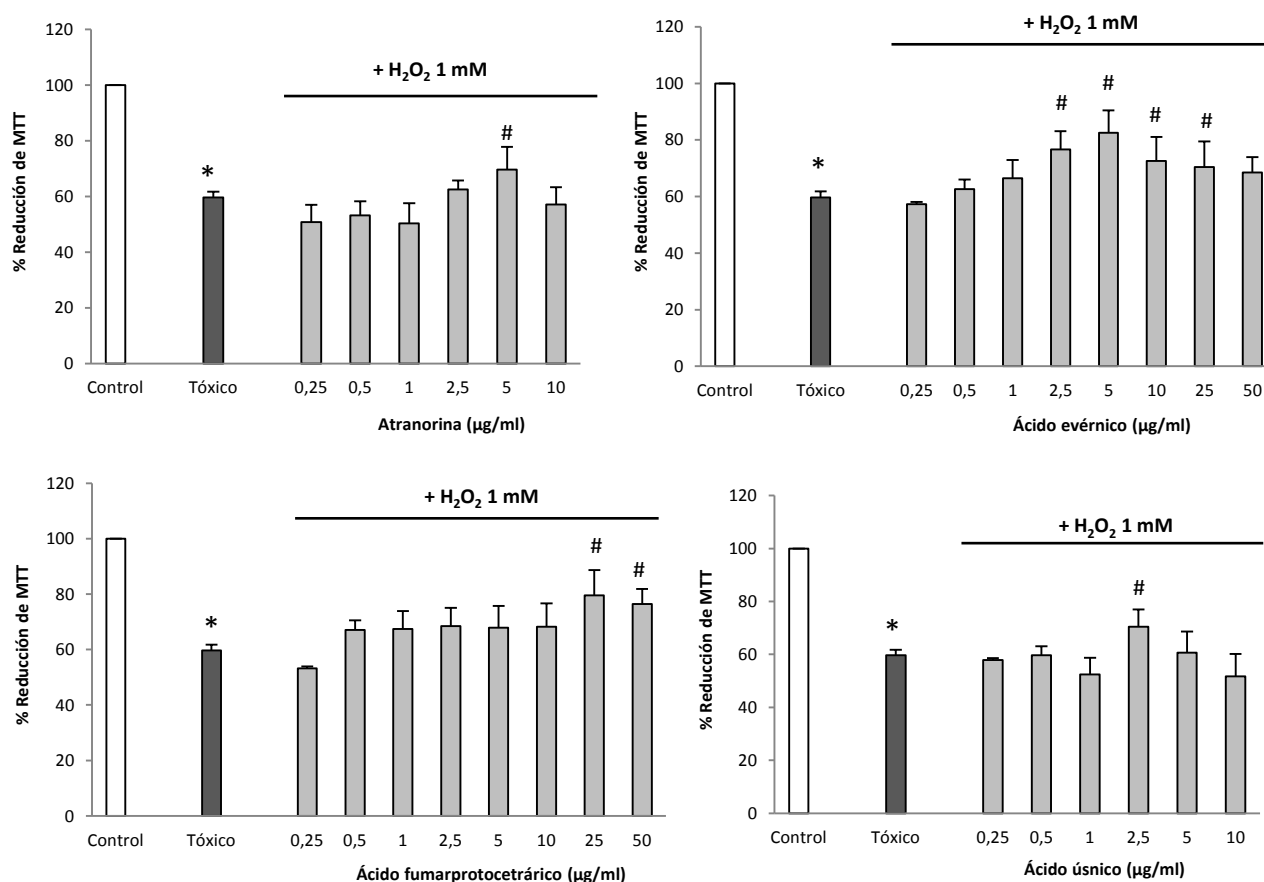


Figura 43. Efecto citoprotector de los metabolitos liquénicos frente al estrés oxidativo inducido por  $\text{H}_2\text{O}_2$  en las células U373-MG. Las células se pre-tratan con las concentraciones no citotóxicas de los compuestos (24 h) y se exponen luego a  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM (30 min). La viabilidad celular se expresa como reducción de MTT en % respecto al control de células sin tratar (100% de viabilidad). Los resultados se expresan como media  $\pm$  DE. \* p < 0,05 versus control; # p < 0,05 versus  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Tóxico:  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

La pre-incubación de las células U373-MG con los metabolitos liquénicos protege a las mismas frente a la pérdida de actividad mitocondrial debida a  $H_2O_2$ . Concretamente, los ácidos evérnico y fumarprotocetrárico son los que ejercen el mayor efecto citoprotector (que en este caso no es concentración-dependiente). Cuatro de las concentraciones ensayadas de EVE, así como dos concentraciones de FUM, protegen significativamente a los astrocitos frente al daño oxidativo, recuperando una mayor capacidad de reducción del MTT. La citoprotección más efectiva se consigue con EVE 5  $\mu\text{g/ml}$  y con FUM 25  $\mu\text{g/ml}$ . Atranorina y ácido úsnico ejercen un efecto protector que puede considerarse moderado si se expresa en términos de comparación con los compuestos más activos (EVE y FUM). Aun así, ATR es capaz de revertir significativamente la citotoxicidad ejercida por  $H_2O_2$  a la concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$ , y USN a la concentración de 2,5  $\mu\text{g/ml}$ .

En este punto, y para continuar el estudio del potencial neuroprotector de los metabolitos aislados, se selecciona la concentración de cada uno de ellos que ha ejercido el efecto citoprotector más significativo frente a  $H_2O_2$  en cada una de las líneas celulares derivadas de SNC. Dichas concentraciones se presentan en la Tabla 17, y son las utilizadas en los ensayos de actividad farmacológica referidos a partir del siguiente apartado del trabajo.

Tratamiento	Modelo celular SH-SY5Y	Incremento de viabilidad celular (vs $H_2O_2$ )	Modelo celular U373-MG	Incremento de viabilidad celular (vs $H_2O_2$ )
Atranorina	5 $\mu\text{g/ml}$ (13,36 $\mu\text{M}$ )	14,70%	5 $\mu\text{g/ml}$ (13,36 $\mu\text{M}$ )	10,05%
Ácido evérnico	5 $\mu\text{g/ml}$ (15,05 $\mu\text{M}$ )	20,55%	5 $\mu\text{g/ml}$ (15,05 $\mu\text{M}$ )	22,93%
Ácido fumarprotocetrárico	1 $\mu\text{g/ml}$ (2,12 $\mu\text{M}$ )	19,54%	25 $\mu\text{g/ml}$ (52,92 $\mu\text{M}$ )	20,04%
Ácido úsnico	1 $\mu\text{g/ml}$ (2,90 $\mu\text{M}$ )	14,72%	2,5 $\mu\text{g/ml}$ (7,26 $\mu\text{M}$ )	11,85%

Tabla 17. Concentraciones seleccionadas por ejercer el mayor efecto citoprotector para cada extracto liquénico y línea celular. Se muestra el incremento de viabilidad celular que ejerce cada pre-tratamiento respecto a las células tratadas sólo con  $H_2O_2$  (reducción en la viabilidad celular del 45% y del 40% en células SH-SY5Y y U373-MG, respectivamente).

### 3.1.4. Estudio de la morfología celular

Para completar el estudio de la morfología celular iniciado con los extractos liquénicos, se evalúan los efectos debidos a los tratamientos con los compuestos aislados, usando un microscopio de contraste de fases.

#### 3.1.4.1. Modelo celular SH-SY5Y

En la Figura 44 se muestran las imágenes representativas, obtenidas bajo un objetivo de 10X, de los efectos de los diferentes tratamientos sobre la morfología de las células SH-SY5Y. Dichas células pierden su morfología triangular/poligonal normal y sus prolongaciones específicas (neuritas) cuando se someten al estrés oxidativo que genera el  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,1 mM, 30 min). Del mismo modo, se observa una pérdida de la adherencia y disminución de su número y tamaño.

En cambio, si se someten a un pre-tratamiento (24 h) con las concentraciones óptimas de cada metabolito, esos efectos se reducen parcialmente. El efecto citoprotector que se ha demostrado para dichas concentraciones se traduce en una reversión de los efectos del daño oxidativo sobre la morfología. El tratamiento más eficaz lo constituye el ácido evérnico, que consigue atenuar el deterioro morfológico y la pérdida de adherencia de las células, de tal manera que éstas presentan una morfología muy similar a las células control. También es destacable la protección hasta una morfología normalizada por parte del ácido fumarprotocetrárico; le siguen en actividad en este campo el ácido úsnico y atranorina.

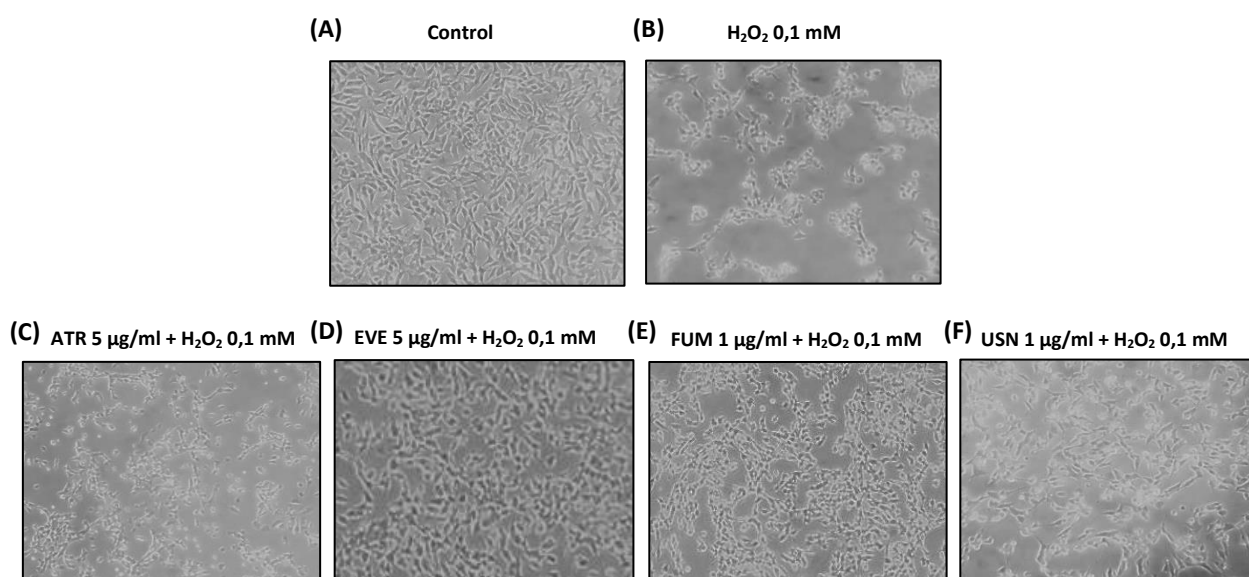


Figura 44. Efecto de los metabolitos secundarios liquénicos sobre la morfología de las células SH-SY5Y. Pre-incubación con los compuestos a las concentraciones indicadas (24 h) previo a la exposición a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,1 mM, 30 min). Fotografías representativas de cada tratamiento, utilizando una cámara Moticam 2500 acoplada al microscopio, y con un objetivo 10X. (A) Células control, (B)  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,1 mM, (C) Atranorina +  $\text{H}_2\text{O}_2$ , (D) Ácido evérnico +  $\text{H}_2\text{O}_2$ , (E) Ácido fumarprotocetrárico +  $\text{H}_2\text{O}_2$ , (F) Ácido úsnico +  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### 3.1.4.2. Modelo celular U373-MG

De forma similar a las células SH-SY5Y, tal y como se observa en la Figura 45, las células U373-MG disminuyen su número y ven afectada su morfología normal cuando son expuestas a la inducción de estrés oxidativo por  $H_2O_2$ . Así, reducen su tamaño y pierden parte de sus ramificaciones. Sin embargo, el pre-tratamiento durante 24 h con los metabolitos secundarios de líquenes (a las concentraciones óptimas de citoprotección) atenúa esas modificaciones debidas al daño oxidativo, presentando las células un aspecto más similar a las células control, con morfología tipo estrellada y ramificaciones diversas. El número de células también se mantiene más constante, lo que se relaciona con el aumento en la viabilidad celular previamente demostrado (Figura 45). El efecto protector más significativo se aprecia en las células pre-tratadas con ácido evérnico 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , que presentan una morfología muy similar a las células control y los cambios debidos al  $H_2O_2$  son difícilmente apreciables.

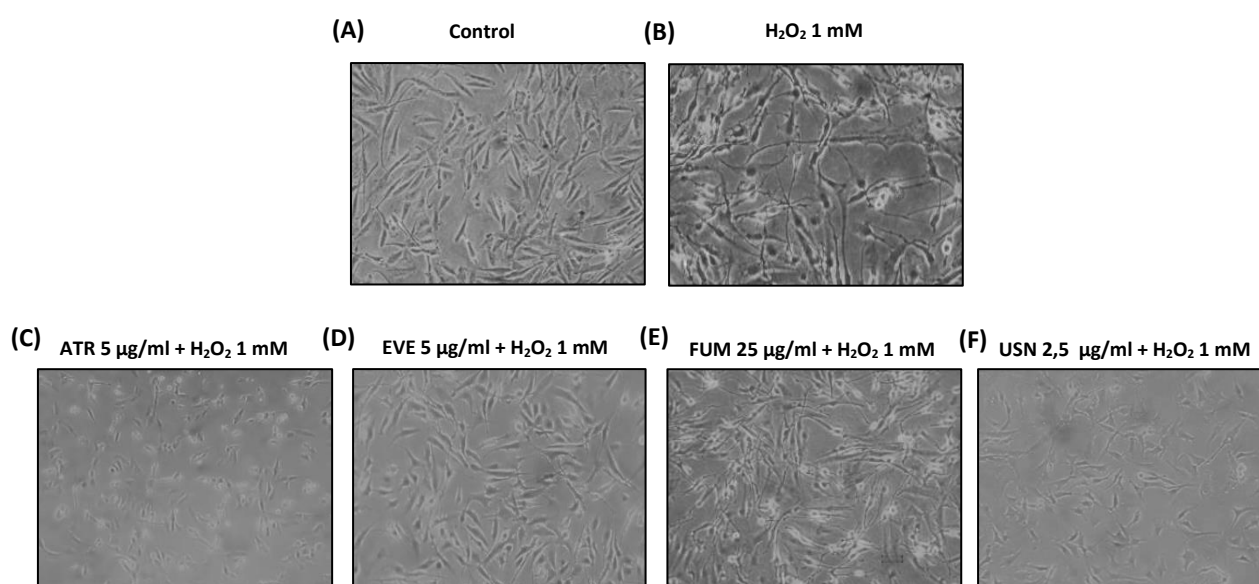


Figura 45. Efecto de los metabolitos secundarios líquénicos sobre la morfología de las células U373-MG. Pre-incubación con los compuestos a las concentraciones indicadas (24 h) previo a la exposición a  $H_2O_2$  (1 mM, 30 min). Fotografías representativas de cada tratamiento, utilizando una cámara Moticam 2500 acoplada al microscopio, y con un objetivo 10X. (A) Células control, (B)  $H_2O_2$  0,1 mM, (C) Atranorina +  $H_2O_2$ , (D) Ácido evérnico +  $H_2O_2$ , (E) Ácido fumarprotocetrárico +  $H_2O_2$ , (F) Ácido úsnico +  $H_2O_2$ .

### 3.1.5. Marcadores de estrés oxidativo

#### 3.1.5.1. Generación intracelular de ERO

Tal y como se ha comentado en la Introducción del presente trabajo, niveles elevados de ERO generan un estrés oxidativo intracelular. El peróxido de hidrógeno a concentraciones altas es capaz de promover la producción endógena de otras ERO (p. ej., de radical hidroxilo mediante la reacción de Fenton) y favorecer la situación de EO. Por ello, se ha determinado bajo las condiciones experimentales establecidas en nuestro trabajo, y mediante el ensayo de la DCFH-DA, los niveles de ERO intracelulares como marcador de EO

##### 3.1.5.1.1. Modelo celular SH-SY5Y

En primer lugar, se analiza el efecto sobre los niveles de ERO de los tratamientos de las células SH-SY5Y con los metabolitos liquénicos a las concentraciones óptimas seleccionadas. Dichos tratamientos no generan por sí mismos una sobre-producción de ERO con respecto a la que existe de forma basal en las células control sin tratar (100% generación de ERO) (Figura 46A), no comprometiendo, por tanto, la viabilidad celular como consecuencia del daño oxidativo.

También se evalúa la acción pro-oxidante del  $\text{H}_2\text{O}_2$  exógeno (0,1 mM, 30 min) y su capacidad de inducir la generación de ERO en las células SH-SY5Y; en estas células se observan niveles cercanos al 130% de producción de ERO durante todo el experimento, lo que confirma la inducción del daño oxidativo debida a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Sin embargo, si las células se pre-tratan con las concentraciones seleccionadas de los poliquétidos liquénicos se observan niveles significativamente reducidos de ERO, que en muchos casos están cercanos a los presentes en células control (Figura 46B), lo que permite deducir su efecto citoprotector.

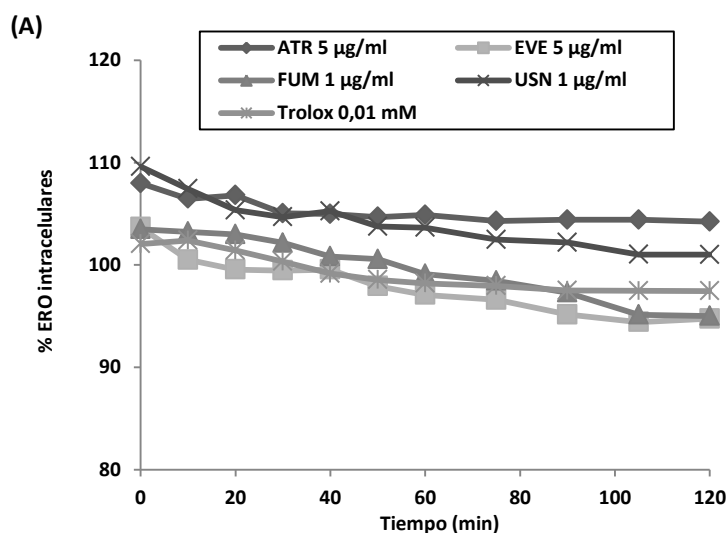


Figura 46. Efectos sobre la producción de ERO intracelulares. *Continúa en la siguiente página.*

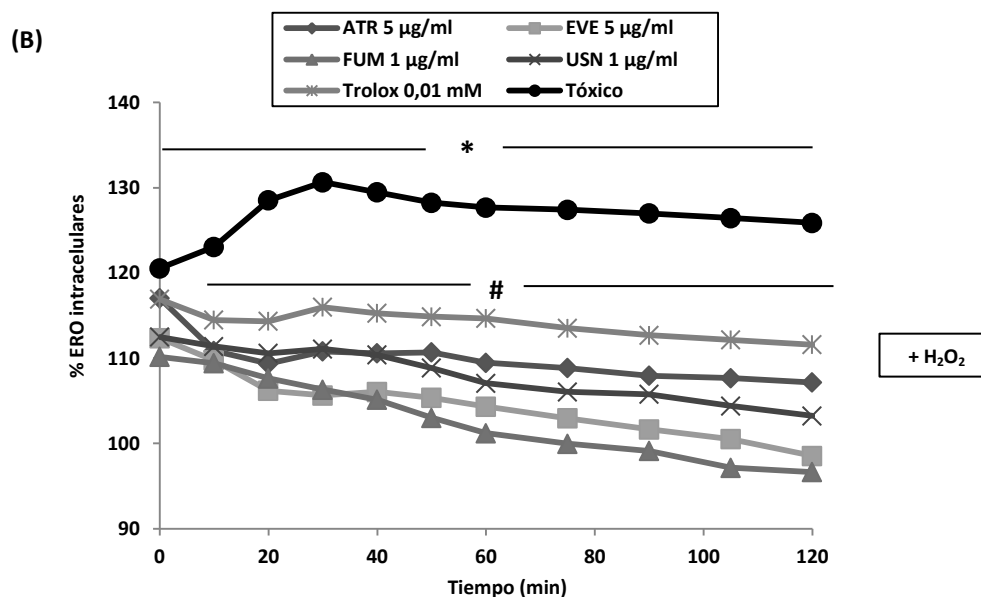


Figura 46. Efectos sobre la producción de ERO intracelulares. (A) Las células SH-SY5Y se tratan con los metabolitos aislados a las concentraciones seleccionadas. (B) Las células SH-SY5Y se pre-tratan con los compuestos (24 h) y luego se exponen al efecto del  $H_2O_2$  (0,1 mM, 30 min). La producción intracelular de ERO se mide durante 2 h, y los resultados se expresan como % ERO respecto al control (100%). \*  $p < 0,05$  versus control; #  $p < 0,05$  versus  $H_2O_2$ . Tóxico:  $H_2O_2$ .

Todos compuestos en estudio ejercen una disminución del EO más marcada o, al menos, similar a la que genera el antioxidante de referencia trolox (0,01 mM, 24 h). Los pre-tratamientos (24 h) con FUM 1 µg/ml y EVE 5 µg/ml son los más efectivos para prevenir del aumento de niveles de ERO intracelulares provocado por  $H_2O_2$ . Dichos tratamientos consiguen reducir la formación de ERO hasta los niveles que presentan las células control, revirtiendo por completo el aumento de ERO al final del ensayo.

### 3.1.5.1.2. Modelo celular U373-MG

El ensayo de la diclorofluoresceína demuestra que los tratamientos de las células U373-MG con los compuestos liquénicos a las concentraciones seleccionadas (24 h) no inducen una mayor producción de ERO respecto a las células sin tratar. En cambio, el tratamiento con EVE 5 µg/ml es incluso capaz de reducir la producción basal de ERO respecto a las células control, lo que supone una mejora del estado redox celular (Figura 47A).

Bajo las condiciones experimentales establecidas, las células modelo de astrogliá también presenta mayores niveles de estrés oxidativo, expresado como generación intracelular de ERO, cuando se exponen a  $H_2O_2$  exógeno (1 mM, 30 min). Si, como se viene analizando en los ensayos anteriores, esas células se pre-tratan con los metabolitos liquénicos, se atenúa de manera significativa la situación de EO intracelular.

En la Figura 47B, se muestra que el efecto citoprotector frente al EO mediado por los metabolitos liquénicos en las células U373-MG puede deberse, al menos en parte, a su capacidad para disminuir la producción de ERO intracelulares. Todos los tratamientos, excepto ATR 5  $\mu\text{g/ml}$  en la parte final del ensayo, son capaces de prevenir de forma significativa los mayores niveles de ERO provocados por  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El efecto más destacable es el de EVE 5  $\mu\text{g/ml}$ , que disminuye la generación de ERO en mayor medida que el antioxidante de referencia (trolox 0,1 mM, 24 h), manteniéndolos en valores similares a los de células control.

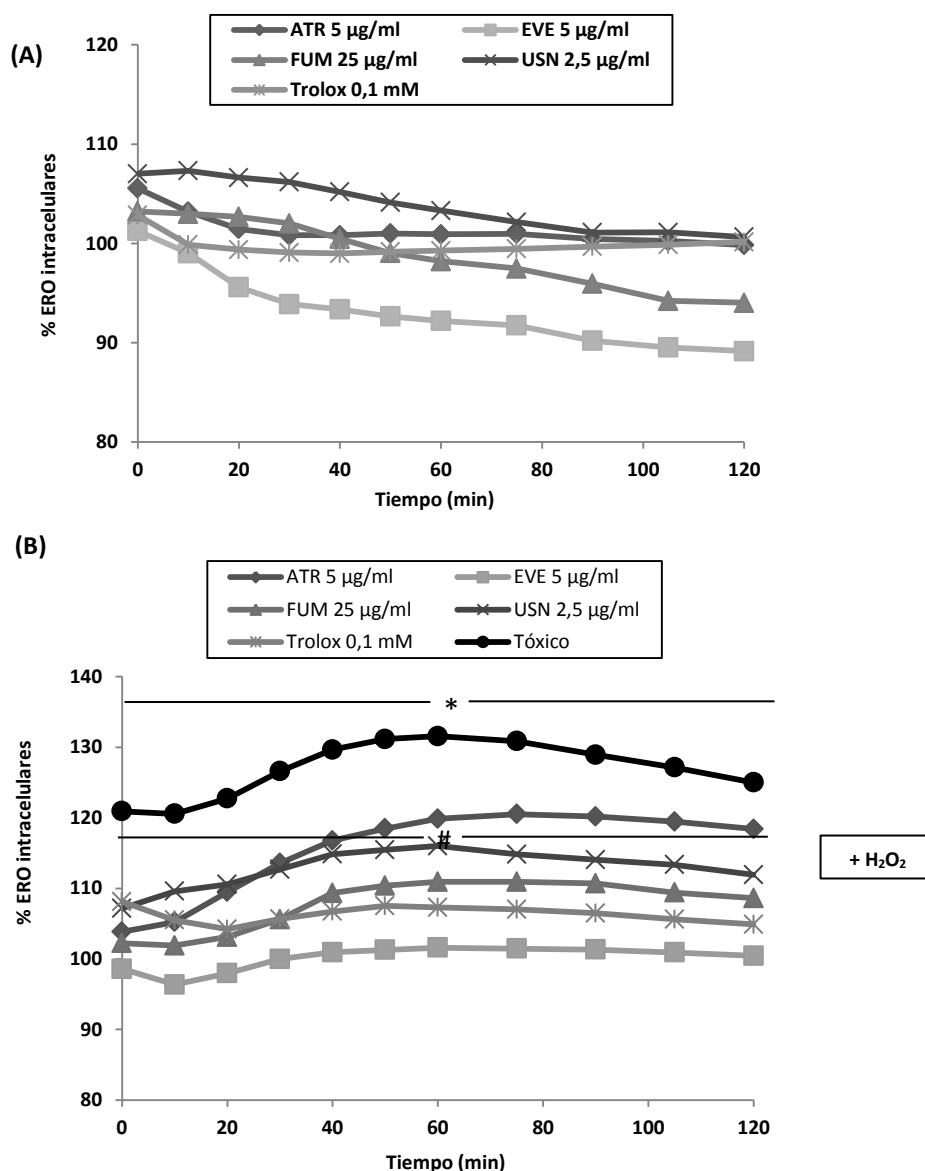


Figura 47. Efectos sobre la producción de ERO intracelulares. (A) Las células U373-MG se tratan con los metabolitos aislados a las concentraciones seleccionadas. (B) Las células U373-MG se pre-tratan con los extractos (24 h) y luego se exponen al efecto del  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM, 30 min). La producción intracelular de ERO se mide durante 2 h, y los resultados se expresan como % ERO respecto al control (100%). \*  $p < 0,05$  versus control; #  $p < 0,05$  versus  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Tóxico:  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



### 3.1.5.2. Peroxidación lipídica

El siguiente paso ha consistido en evaluar los efectos de los compuestos liquénicos aislados sobre la peroxidación lipídica, entendiendo dicho proceso como uno de los marcadores bioquímicos del estado redox celular más comúnmente utilizado. Los mayores niveles de peroxidación lipídica en situaciones de EO se correlacionan con niveles anormalmente elevados de MDA, que es un subproducto final del proceso. En este trabajo, hemos cuantificado los niveles de MDA por HPLC (tal y como se detalla en el apartado 2.1.3. de Material y Métodos), como indicador de peroxidación lipídica.

#### 3.1.5.2.1. Modelo celular SH-SY5Y

El modelo de células neuronales, representado por la línea celular SH-SY5Y, evidencia un aumento de la peroxidación de lípidos de membrana cuando éstas se exponen a un inductor de estrés oxidativo ( $\text{H}_2\text{O}_2$  en el presente trabajo). Así, un tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  exógeno (0,1 mM, 30 min) duplica los niveles de MDA respecto a las células control sin tratar, demostrando un aumento significativo de lipoperoxidación.

Los resultados recogidos en la Figura 48 muestran que ninguno de los compuestos en estudio provoca, a las concentraciones ensayadas, la degradación de las membranas biológicas por peroxidación lipídica, pues no hay variación significativa de los niveles de MDA con respecto a los encontrados en las células control sin tratar. En cambio, esos mismos tratamientos, cuando se administran en un paso previo a la exposición al  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sí que inhiben de forma significativa la formación de MDA, atenuando la peroxidación de lípidos en condiciones de EO.

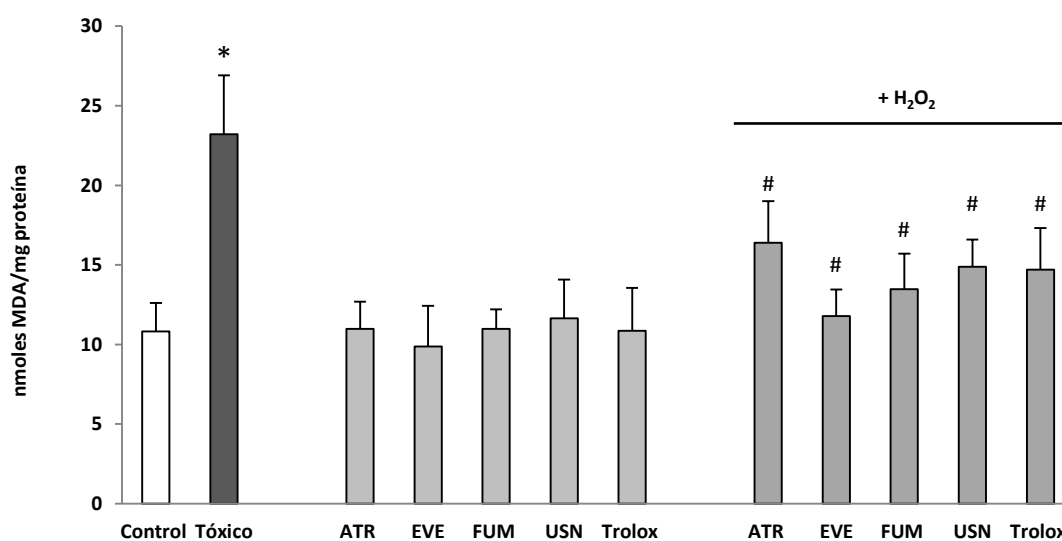


Figura 48. Cuantificación de los niveles de MDA. Las células SH-SY5Y se incuban con los compuestos aislados (concentraciones seleccionadas, 24 h) y/o con exposición posterior a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,1 mM, 30 min). Los niveles de MDA se expresan como nmoles/mg proteína, y como media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$  versus control; #  $p < 0,05$  versus  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Tóxico:  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Dicha inhibición de la formación de MDA ejercida por los metabolitos liquénicos es comparable a la demostrada por el trolox. El orden de la potencia anti-lipoperoxidación de los compuestos en estudio es el siguiente: EVE 5  $\mu\text{g/ml}$  > FUM 1  $\mu\text{g/ml}$  > USN 1  $\mu\text{g/ml}$  > ATR 5  $\mu\text{g/ml}$ .

### 3.1.5.2.2. Modelo celular U373-MG

Como se ha comentado anteriormente (Figura 31), las células U373-MG presentan, en condiciones normales de cultivo, menores niveles de MDA que las células SH-SY5Y, lo que puede deberse a su mayor capacidad antioxidante que inhibe la peroxidación de lípidos celulares. Así, se observa que las células U373-MG control tienen niveles basales de 2,0 nmoles MDA/mg de proteína, mientras que cuando se induce una situación de EO por  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM, 30 min), las células presentan mayores cantidades de MDA, hasta 5,6 nmoles MDA/mg proteína.

Cuando se tratan con los compuestos en estudio, las células U373-MG no muestran en ningún caso variaciones significativas de concentración de MDA, en comparación con las células sin tratar. Sin embargo, el pre-tratamiento de las células con todos los metabolitos liquénicos (24 h), previo a la inducción de EO, sí reduce considerablemente la formación de MDA como subproducto de la peroxidación lipídica en comparación con las células expuestas a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Destaca un potente efecto de inhibición de la peroxidación lipídica con el pre-tratamiento con EVE 5  $\mu\text{g/ml}$  y FUM 1  $\mu\text{g/ml}$ , que reducen los niveles de MDA por debajo de 3 nmoles MDA/mg proteína. El efecto de ATR y USN es significativo respecto a las células sólo tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pero algo más moderado (Figura 49).

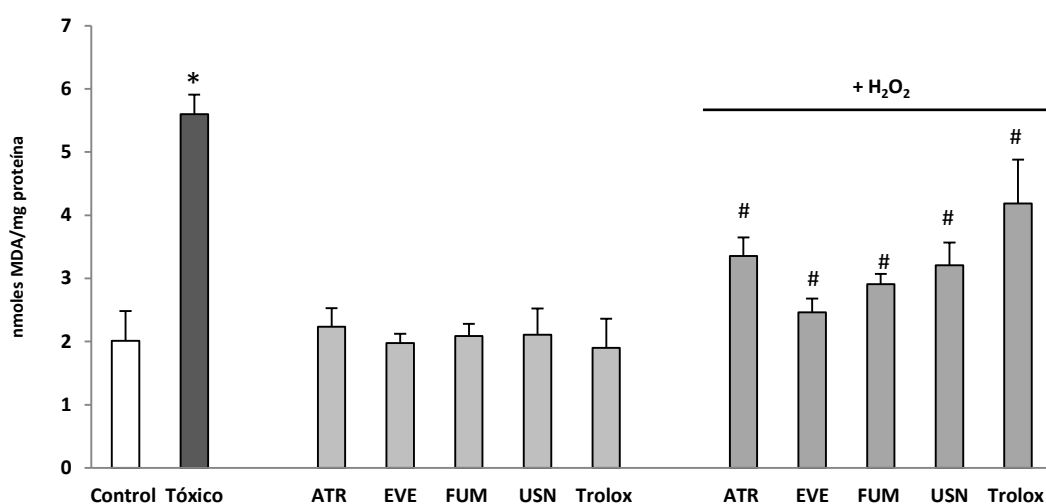


Figura 49. Cuantificación de los niveles de MDA. Las células U373-MG se incuban con los compuestos aislados (concentraciones seleccionadas, 24 h) y/o con exposición posterior a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM, 30 min). Los niveles de MDA se expresan como nmoles/mg proteína, y como media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$  versus control; #  $p < 0,05$  versus  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Tóxico:  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### 3.1.5.3. Glutación reducido y oxidado

El estado del sistema antioxidante glutación, como principal antioxidante endógeno no enzimático del organismo (y de especial relevancia en SNC), se ha estimado en el presente trabajo por un método fluorimétrico. La determinación de los niveles de GSH y de GSSG bajo los distintos tratamientos permite estimar el efecto antioxidante de los metabolitos de líquenes parmeliáceos.

#### 3.1.5.3.1. Modelo celular SH-SY5Y

Tal y como se muestra en la Figura 50, las células modelo de neurona contienen una mayor cantidad de GSH que de GSSG en condiciones basales (que se traduce en un valor del ratio GSH/GSSG de 4,5) favoreciendo un estado reducido de las biomoléculas en la célula. Cuando las células SH-SY5Y son tratadas solamente con los metabolitos liquénicos (24 h) también presentan en estado reducido (GSH) casi todo el glutatión detectado, y no hay variaciones significativas del ratio GSH/GSSG respecto a las células control, lo que indica que no actúan como pro-oxidantes a las concentraciones ensayadas.

Por otro lado, al ser expuestas a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,1 mM, 30 min), se verifica la inducción del estrés oxidativo en las células SH-SY5Y mediante una reducción significativa del contenido de GSH y un aumento de la concentración de GSSG. En este caso, el ratio GSH/GSSG se ve disminuido hasta un cuarto del valor que presenta en células control sin tratar. En cambio, si las células se pre-tratan con las concentraciones citoprotectoras de los compuestos liquénicos previamente a la inducción de EO, presentan una atenuación significativa en los cambios en los niveles de GSH y GSSG, de manera que la reducción del valor del ratio GSH/GSSG es más leve.

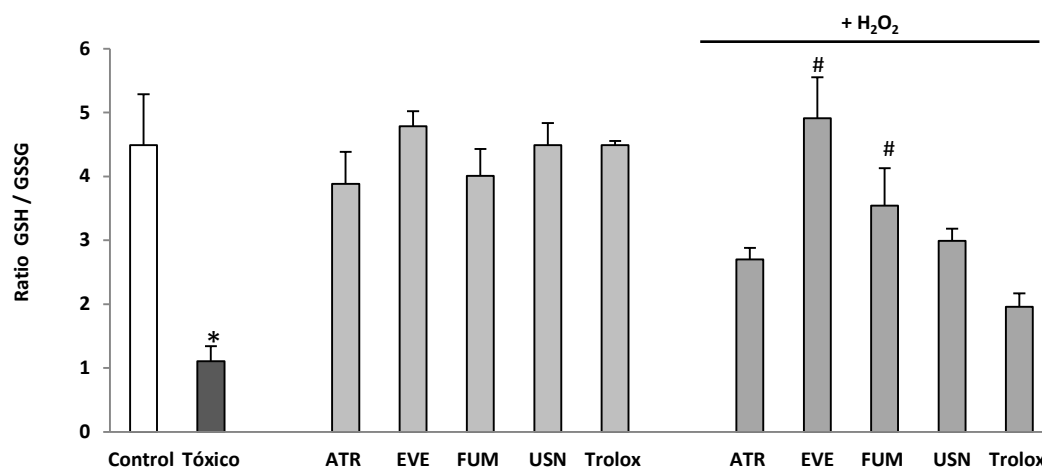


Figura 50. Efectos sobre los niveles del sistema antioxidante glutación. Las células SH-SY5Y se incuban con los metabolitos liquénicos (concentraciones seleccionadas, 24 h) y/o con exposición posterior a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,1 mM, 30 min). Los resultados se expresan como índice redox GSH/GSSG, y como media  $\pm$  DE.  
\*  $p < 0,05$  versus control; #  $p < 0,05$  versus  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Tóxico:  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

A la vista de los resultados, se observa que los pre-tratamientos con EVE 5  $\mu\text{g/ml}$  y FUM 1  $\mu\text{g/ml}$  (en ese orden) mejoran el potencial antioxidante de las células SH-SY5Y, respecto a las células sólo tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; revierten la disminución de GSH y el aumento de GSSG, de forma que la célula puede combatir mejor el EO.

### 3.1.5.3.2. Modelo celular U373-MG

Según los resultados obtenidos, las células U373-MG sin tratar presentan mayores niveles de GSH en comparación con el contenido de GSSG, lo que se traduce en un índice redox más favorable que el de las células SH-SY5Y (el valor del ratio GSH/GSSG es de 11,7 en el modelo de astrglía). Esta situación no se ve alterada por el tratamiento con los compuestos liquénicos a las concentraciones seleccionadas, que mantienen estable el potencial antioxidante del sistema glutatión.

Como se muestra en la Figura 51, la exposición de las células U373-MG a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM, 30 min) ejerce un efecto pro-oxidante y modifica en gran medida los niveles de GSH y GSSG en sentidos contrarios (disminuye el primero y aumenta el segundo) de forma que la célula pierde significativamente la capacidad antioxidante debida a GSH. Sin embargo, el pre-tratamiento de las células con los compuestos EVE 5  $\mu\text{g/ml}$  y FUM 1  $\mu\text{g/ml}$  (24 h), anterior a la incubación con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , previene de los cambios en los niveles de GSH y GSSG inducidos por esta ERO. Las células pre-tratadas con EVE muestran, incluso, niveles de GSH similares a los de las células control (ratio GSH/GSSG: 12,1).

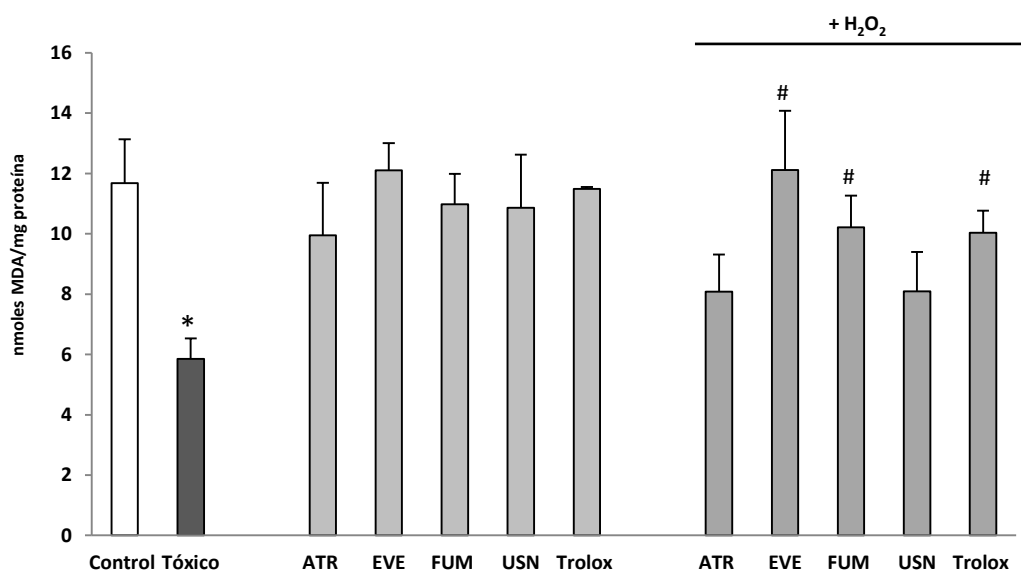


Figura 51. Efectos sobre los niveles del sistema antioxidante glutatión. Las células U373-MG se incuban con los metabolitos liquénicos (concentraciones seleccionadas, 24 h) y/o con exposición posterior a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM, 30 min). Los resultados se expresan como índice redox GSH/GSSG, y como media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$  versus control; #  $p < 0,05$  versus  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Tóxico:  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### 3.1.6. Efecto sobre el sistema antioxidante enzimático

Tras determinar la actividad captadora de radicales libres por parte de los compuestos liquénicos en estudio, así como su capacidad de modular ciertos marcadores de estrés oxidativo (entre ellos el sistema antioxidante endógeno glutatión), se evalúa si la disminución intracelular de EO puede deberse a una inducción del sistema antioxidante enzimático celular. Para investigar este mecanismo antioxidante de acción indirecta, se miden mediante Western blot, en los extractos celulares totales de los dos modelos de neurona y astrogliá, los niveles de expresión proteica de las principales enzimas antioxidantes: catalasa (CAT), superóxido dismutasa-1 (SOD-1), superóxido dismutasa-2 (SOD-2), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y hemooxigenasa-1 (HO-1). Se realiza un pre-tratamiento (24 h) de las células con las concentraciones seleccionadas de cada metabolito y se exponen posteriormente al tóxico generador de EO ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), con el fin de analizar si los compuestos en estudio son capaces de inducir previamente la expresión enzimática que incremente el potencial antioxidante y prevenga a las células de los efectos del daño oxidativo.

#### 3.1.6.1. Modelo celular SH-SY5Y

Los resultados de expresión proteica obtenidos para las células SH-SY5Y muestran, de forma general, que el potencial enzimático antioxidante de estas células se ve disminuido cuando se someten a la inducción del EO usado como modelo de estudio en el presente trabajo ( $\text{H}_2\text{O}_2$  0,1 mM, 30 min). Si se compara con células control, las células expuestas a  $\text{H}_2\text{O}_2$  presentan niveles significativamente reducidos de expresión proteica de las seis enzimas antioxidantes evaluadas.

✓ **Catalasa (CAT).** La expresión proteica de la enzima CAT disminuye de forma significativa, detectándose niveles de proteína un 19% más bajos que en las células control. Sin embargo, un pre-tratamiento de 24 h con los compuestos EVE 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y FUM 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  se muestra eficaz a la hora de inducir una mayor expresión de la enzima, revirtiendo la caída de los niveles proteicos tras la posterior exposición a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . EVE es el compuesto más activo ya que aumenta en más del 30% la expresión de CAT, en comparación con células sólo tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Este hallazgo se correlaciona con el hecho de que EVE es el único compuesto que, en tratamiento de 24 h y sin posterior exposición a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , induce una expresión de CAT significativamente superior a la existente en células control. Los resultados de expresión de CAT tras pre-tratamientos con ATR 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y USN 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , aunque también son ligeramente superiores a los de células sólo tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , no presentan significación estadística (Figura 52A).

✓ **Superóxido dismutasa (SOD).** La expresión proteica de las enzimas SOD también se ve afectada bajo la inducción del daño oxidativo en la línea celular SH-SY5Y. Al comparar con las células control, las tratadas con  $H_2O_2$  muestran una reducción del 15% y del 35% en la expresión de SOD-1 y SOD-2, respectivamente. En el caso de la SOD-1, de nuevo los pre-tratamientos con EVE 5  $\mu g/ml$  y FUM 1  $\mu g/ml$  (previo a la exposición a  $H_2O_2$ ) resultan activos en la inducción de la expresión enzimática, e incrementan significativamente los niveles de proteína (en un 20% y un 18%, respectivamente) respecto a las células sólo tratadas con  $H_2O_2$  (Figura 52B). En relación a la expresión de la SOD-2, todos los tratamientos ensayados previenen significativamente la depleción del enzima causada por el daño oxidativo. Si se compara con células únicamente expuestas a  $H_2O_2$ , se encuentran mayores niveles de enzima SOD-2 con los distintos pre-tratamientos en orden decreciente: EVE > FUM > USN > ATR (Figura 52C). Entre los tratamientos con los compuestos sólo (24 h, y sin exposición posterior a  $H_2O_2$ ), destaca la mayor expresión de SOD-2 demostrada en células tratadas con EVE 5  $\mu g/ml$  y FUM 1  $\mu g/ml$ , con respecto a las células control.

✓ **Glutación peroxidasa (GPx) y glutación reductasa (GR).** Las enzimas relacionadas con el sistema antioxidante glutación también se ven afectadas por el daño oxidativo, y sus niveles de expresión proteica se encuentran significativamente disminuidos. De esta forma, las células SH-SY5Y tratadas sólo con  $H_2O_2$  presentan un menor contenido de GPx y de GR (ambas un 20% menor) en comparación con las células sin tratar. La disminución en los contenidos de GPx y GR se ve marcadamente revertida por los cuatro pre-tratamientos en estudio (Figura 52D-E). Los metabolitos liquénicos aumentan, por tanto, los niveles proteicos de GPx y GR respecto a las células sólo tratadas con  $H_2O_2$ ; destaca una mayor inducción de la expresión de ambas enzimas debida al pre-tratamiento con EVE 5  $\mu g/ml$  (del 43% en GPx y del 30% en GR) y FUM 1  $\mu g/ml$  (del 30% y 23%, respectivamente). Los efectos de ATR y USN son más moderados pero también permiten mantener niveles proteicos similares a los de células control.

✓ **Hemoxigenasa-1 (HO-1).** En relación al estudio de expresión de esta enzima, se observa una significativa disminución de sus niveles proteicos en células expuestas a  $H_2O_2$ , que se reducen en un 20% con respecto a los niveles de células control. En cambio, al pre-tratar las células durante 24 h con los poliquétidos, se observa que EVE y FUM son capaces de promover la expresión de HO-1, observándose niveles proteicos significativamente superiores (un 30% y un 20% más, respectivamente) a los de células sólo tratadas con  $H_2O_2$ . Estos resultados se confirman con el tratamiento de las células con los compuestos sólo (24 h), en los que EVE y FUM inducen niveles de HO-1 significativamente superiores a los de células control. Frente a la caída de los niveles de esta enzima, ATR y USN no ejercer un efecto significativo (Figura 52F).

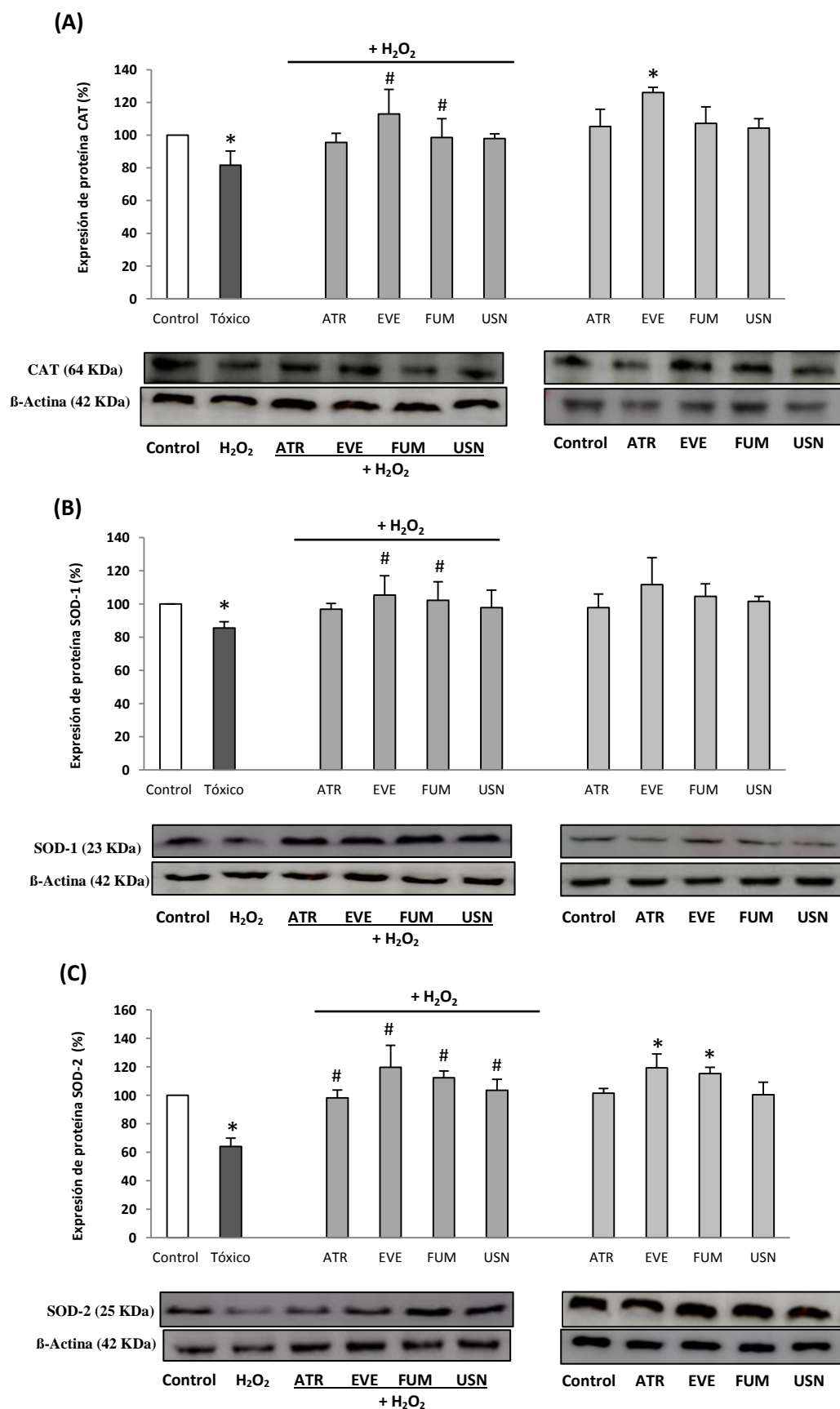


Figura 52. Efecto de los metabolitos liquénicos sobre los niveles de las enzimas antioxidantes en el modelo celular SH-SY5Y. Continúa en la siguiente página.

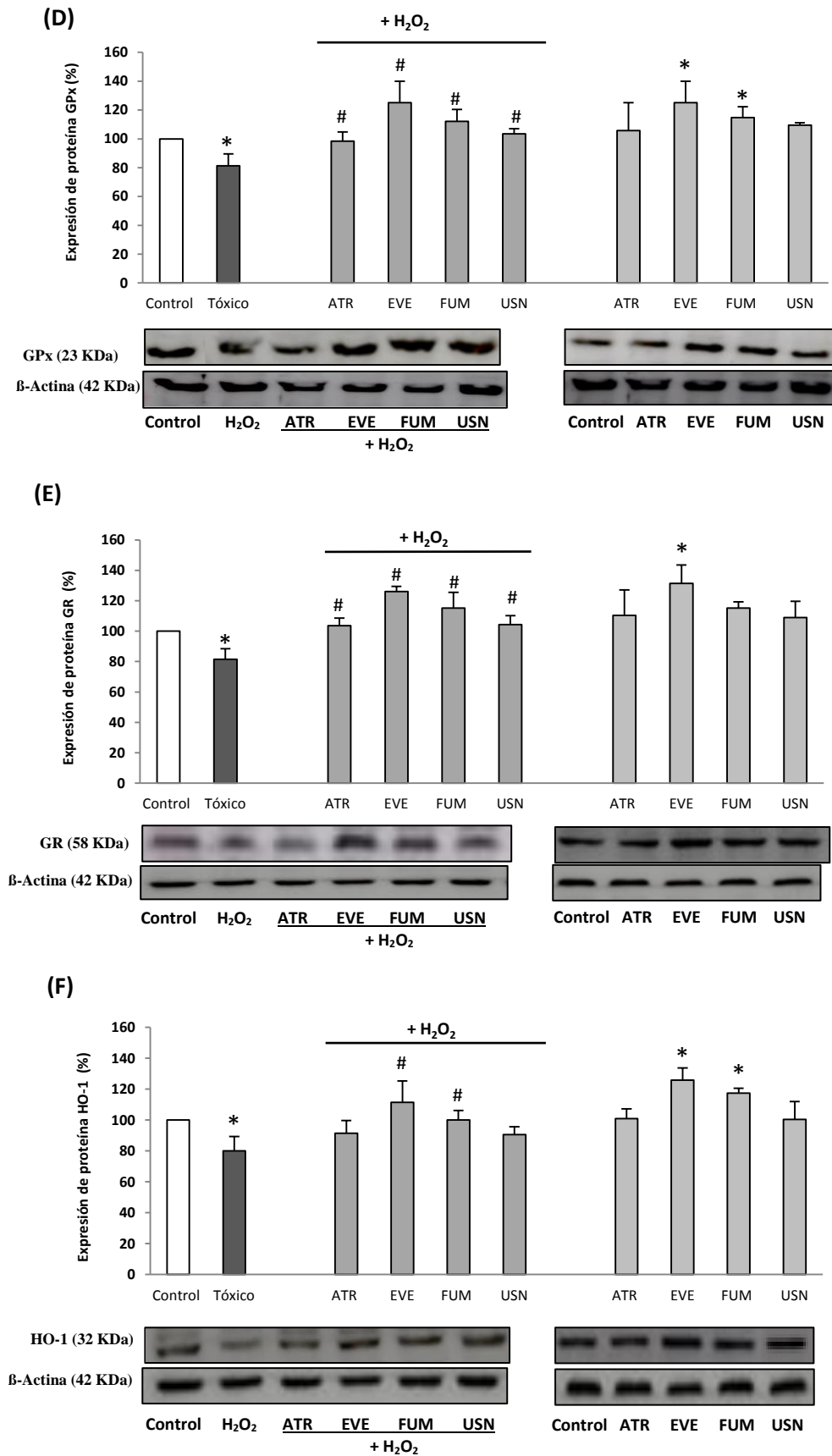


Figura 52. Efecto de los metabolitos liquénicos sobre los niveles de las enzimas antioxidantes CAT (A), SOD-1 (B), SOD-2 (C), GPx (D), GR (E) y HO-1 (F) en el modelo celular SH-SY5Y. Las células se pre-incubaron con los compuestos a las concentraciones seleccionadas (24 h) previo a la exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 mM, 30 min). Los resultados se presentan como % de intensidad de la banda, considerándose como 100% la expresión en células control. La β-actina se utiliza como control de carga. Se muestra una membrana representativa en cada caso. Media ± DE. \*  $p < 0,05$  versus control; #  $p < 0,05$  versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tóxico: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



Parece evidente, por tanto, que los compuestos liquénicos en estudio, y EVE y FUM en particular, en pre-tratamiento de 24 h, inducen la expresión de enzimas antioxidantes en las células SH-SY5Y. Así, el mayor potencial antioxidante intracelular puede proteger frente al daño oxidativo inducido posteriormente por  $H_2O_2$ , explicando sus efectos citoprotectores previamente demostrados.

### 3.1.6.2. Modelo celular U373-MG

Tal y como se ha estudiado para las células del modelo neuronal, se analiza por Western blot el efecto de los compuestos liquénicos sobre la expresión de enzimas antioxidantes (CAT, SOD-1, SOD-2, GR, GPx y HO-1) en la línea celular derivada de astrogliá. En las células U373-MG, se demuestra que la inducción de daño oxidativo por exposición a  $H_2O_2$  (1 mM, 30 min) causa, además de la citotoxicidad previamente demostrada, una disminución significativa de los niveles proteicos de todas las enzimas antioxidantes evaluadas (Figura 53); ésto se traduce en una menor capacidad de dichas células para combatir los altos niveles de ERO.

Sin embargo, si previo a la exposición a  $H_2O_2$ , las células se pre-tratan con los metabolitos liquénicos (24 h), muestran, en los casos que comentaremos a continuación, niveles mayores de expresión proteica. Así, los tratamientos son capaces de prevenir los efectos perjudiciales del EO sobre el sistema antioxidante enzimático. Además, de la cuantificación realizada por densitometría se desprende que, en algunas ocasiones, los compuestos liquénicos incrementan los niveles proteicos de las enzimas antioxidantes por encima de los encontrados en las células control (100% de expresión proteica).

✓ **Catalasa (CAT).** Concretamente, en el estudio de la expresión de CAT, las células tratadas con  $H_2O_2$  muestran una reducción significativa de los niveles de la proteína (del 20% respecto a las células control). Sin embargo, si las células se pre-tratan con EVE 5  $\mu$ g/ml, FUM 25  $\mu$ g/ml y USN 2,5  $\mu$ g/ml, previo a la exposición a  $H_2O_2$ , muestran mayores niveles de expresión de la enzima CAT (respecto a las células sólo tratadas con  $H_2O_2$ ), que se mantiene en concentraciones similares a las de células control (Figura 53A).

✓ **Superóxido dismutasa (SOD).** La expresión de las enzimas SOD-1 y, especialmente, SOD-2, también disminuye de forma significativa en las células U373-MG expuestas a  $H_2O_2$  (en un 15% y un 35% respecto a células control, respectivamente) (Figura 53B-C). El pre-tratamiento con EVE 5  $\mu$ g/ml previene significativamente de la menor expresión de ambas enzimas debida al daño oxidativo en células sólo tratadas con  $H_2O_2$ , encontrándose incluso niveles de SOD-2 muy superiores a los de células control. Los pre-tratamientos con FUM, USN y ATR a las

concentraciones óptimas también mejoran (en ese orden) los niveles de expresión de SOD-2. Los compuestos liquénicos (en tratamientos de 24 h, sin exposición posterior al tóxico) demuestran, en general, una significativa actividad de inducción de la expresión de SOD-2.

✓ **Glutación peroxidasa (GPx) y glutación reductasa (GR).** Las enzimas GPx y GR ven reducida su expresión en un 33% y 23% (respecto al 100% de expresión, que se considera en células control), respectivamente, en las células U373-MG tratadas sólo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esos cambios son revertidos significativamente con un pre-tratamiento con los cuatro compuestos liquénicos en estudio. Así, se cuantifican mayores niveles de ambas proteínas, que presentan un orden decreciente: EVE > FUM > USN > ATR. Destaca la inducción de la expresión proteica que ejercen los ácidos evérnico y fumarprotocetrárico, tras cuyos tratamientos los niveles de GPx y GR son superiores incluso a los encontrados en las células control (Figura 53D-E).

✓ **Hemoxigenasa-1 (HO-1).** Por último, se ha cuantificado la expresión proteica de la enzima HO-1, cuyos resultados se recogen en la Figura 53F. Al tratar las células U373-MG con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, su expresión se reduce significativamente en comparación con las células control (reducción del 18% en la intensidad de banda proteica). Este efecto se revierte cuando se pre-tratan las células con EVE 5 µg/ml y FUM 25 µg/ml, que son capaces de inducir una mayor expresión de la proteína HO-1.

Los resultados obtenidos por Western blot y en el análisis densitométrico (Figuras 52 y 53) sugieren que los compuestos liquénicos (en especial EVE y FUM) ejercen un efecto protector frente a EO en células de SNC, potenciando el sistema antioxidante enzimático. La mayor expresión enzimática se puede correlacionar con la mayor inhibición en la producción de ERO intracelulares provocada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que se ha demostrado en apartados previos.

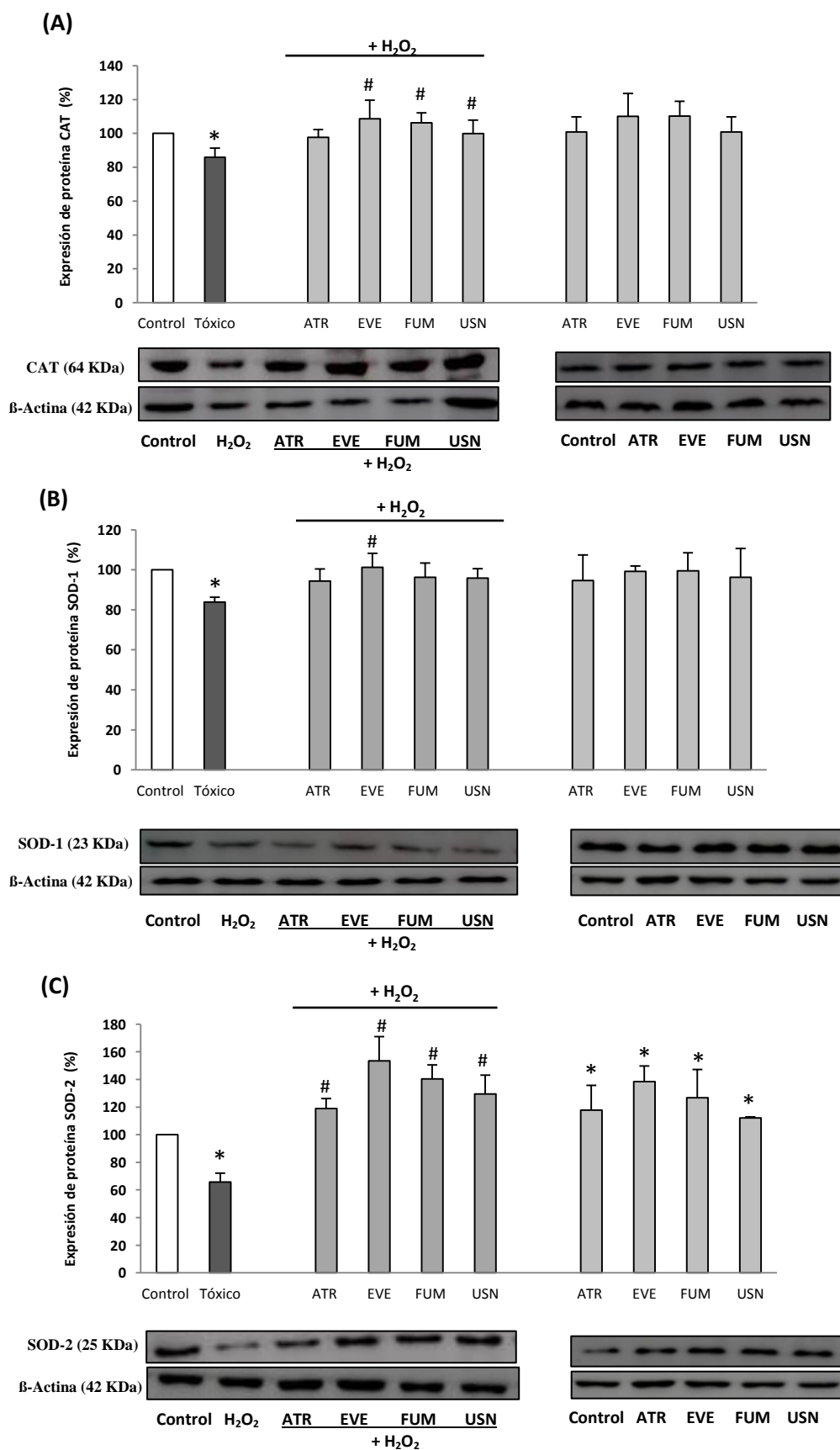


Figura 53. Efecto de los metabolitos liquénicos sobre los niveles de las enzimas antioxidantes en el modelo celular U373-MG. *Continúa en la página siguiente.*

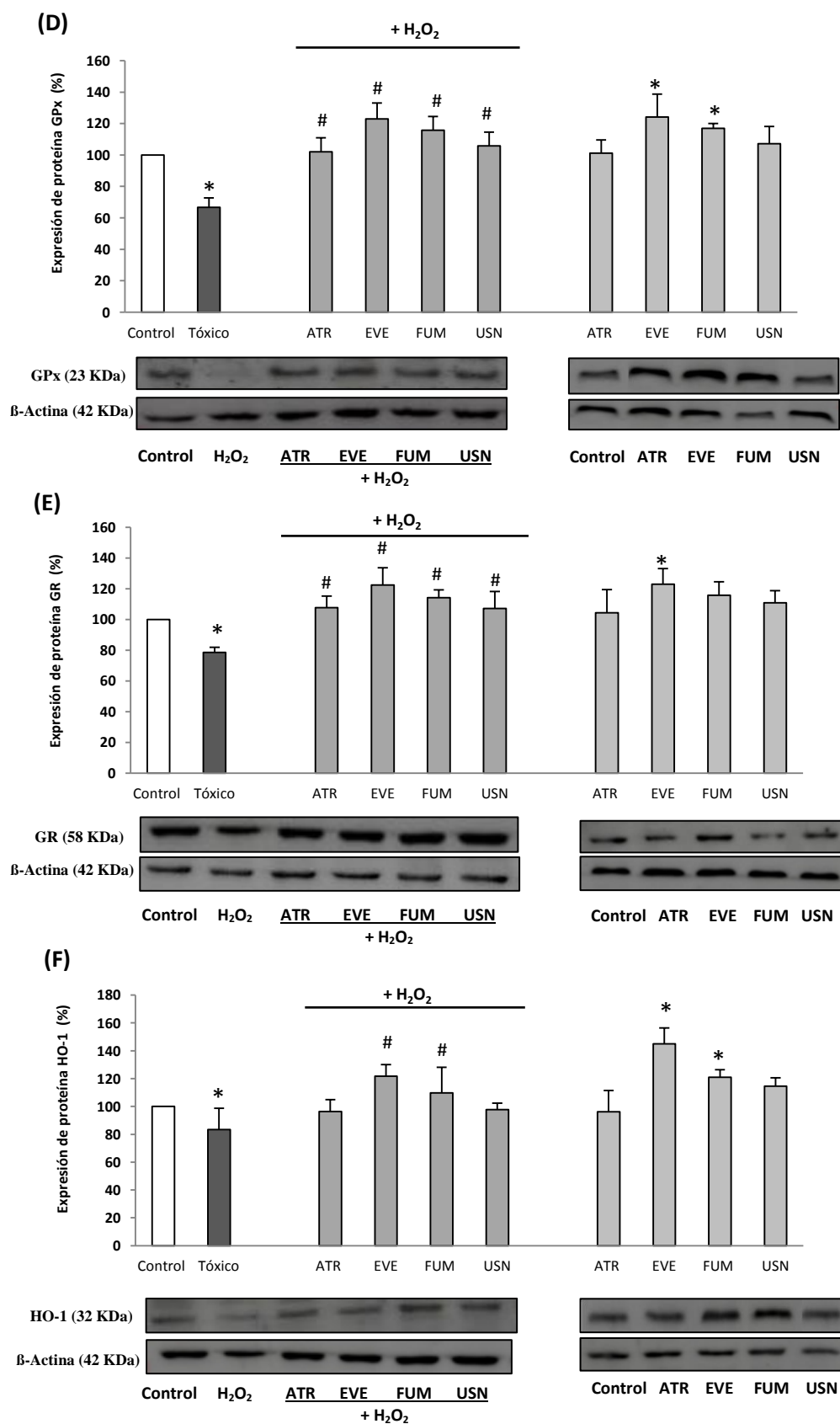


Figura 53. Efecto de los metabolitos liquénicos sobre los niveles de las enzimas antioxidantes CAT (A), SOD-1 (B), SOD-2 (C), GPx (D), GR (E) y HO-1 (F) en el modelo celular U373-MG. Las células U373-MG se preincubaban con los compuestos a las concentraciones seleccionadas (24 h) previo a la exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM, 30 min). Los resultados se presentan como % de intensidad de la banda, considerándose como 100% la expresión en células control. La β-actina se utiliza como control de carga. Se muestra una membrana representativa en cada caso. Media ± DE. \*  $p < 0,05$  versus control; #  $p < 0,05$  versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tóxico: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 3.1.7. Estudio de la activación de la vía Nrf2

El estudio de los efectos de los metabolitos liquénicos en estudio sobre el potencial antioxidante en los dos modelos celulares se completa evaluando la implicación de la vía de señalización intracelular en que participa el factor de transcripción Nrf2. El objetivo es comprobar si la inducción de la expresión de las enzimas antioxidantes por parte de los compuestos en estudio (demostrada en el punto anterior) se produce a través de la activación de la vía Nrf2. Para ello, se van a cuantificar mediante Western blot los niveles proteicos del factor Nrf2 a nivel citoplasmático y nuclear, y se determinará la actividad de unión al ADN nuclear de dicho factor. Se mide el efecto de los tratamientos con los compuestos solos (sin exposición posterior a  $H_2O_2$ ) y previo a la inducción de estrés oxidativo.

#### 3.1.7.1. Determinación de los niveles celulares de Nrf2

Se cuantifican los niveles proteicos de Nrf2 tanto en las fracciones citoplasmática como nuclear, con el fin de investigar si los tratamientos en estudio ejercen una activación de la translocación del factor Nrf2 hacia el núcleo, que es un requisito previo para que este factor ejerza su función moduladora de la transcripción génica.

##### 3.1.7.1.1. Modelo celular SH-SY5Y

La exposición de las células SH-SY5Y a  $H_2O_2$  (0,1 mM, 30 min) provoca la disminución de los niveles totales de proteína Nrf2 respecto a las células control, hallándose una disminución más marcada en la fracción nuclear (Figura 54). Ésto se traduce en un menor ratio Nrf2 nuclear/Nrf2 citoplasmático. Por el contrario, los pre-tratamientos de las células SH-SY5Y con las concentraciones óptimas de ATR, EVE, FUM y USN inducen la expresión de la proteína Nrf2 que se acumula mayoritariamente en el núcleo (el efecto sobre el Nrf2 citoplasmático es menor y sólo significativo para EVE y FUM), donde se encuentran niveles significativamente elevados respecto a las células tratadas sólo con  $H_2O_2$ .

Además, un tratamiento de las células con los cuatro compuestos (24 h), sin exposición posterior a  $H_2O_2$ , también evidencia un aumento significativo de los niveles de Nrf2 nuclear respecto a los de células control. Este resultado, unido al hecho de que no modifican sustancialmente la fracción de Nrf2 citoplasmático, indica que los compuestos liquénicos pueden potenciar la expresión de enzimas antioxidantes a través de la estabilización del factor Nrf2 en el núcleo. El compuesto que se muestra más activo en este ensayo es EVE (mayor ratio

Nrf2 nuclear/citoplasmático), seguido de FUM. USN y ATR presentan un efecto significativo más moderado.

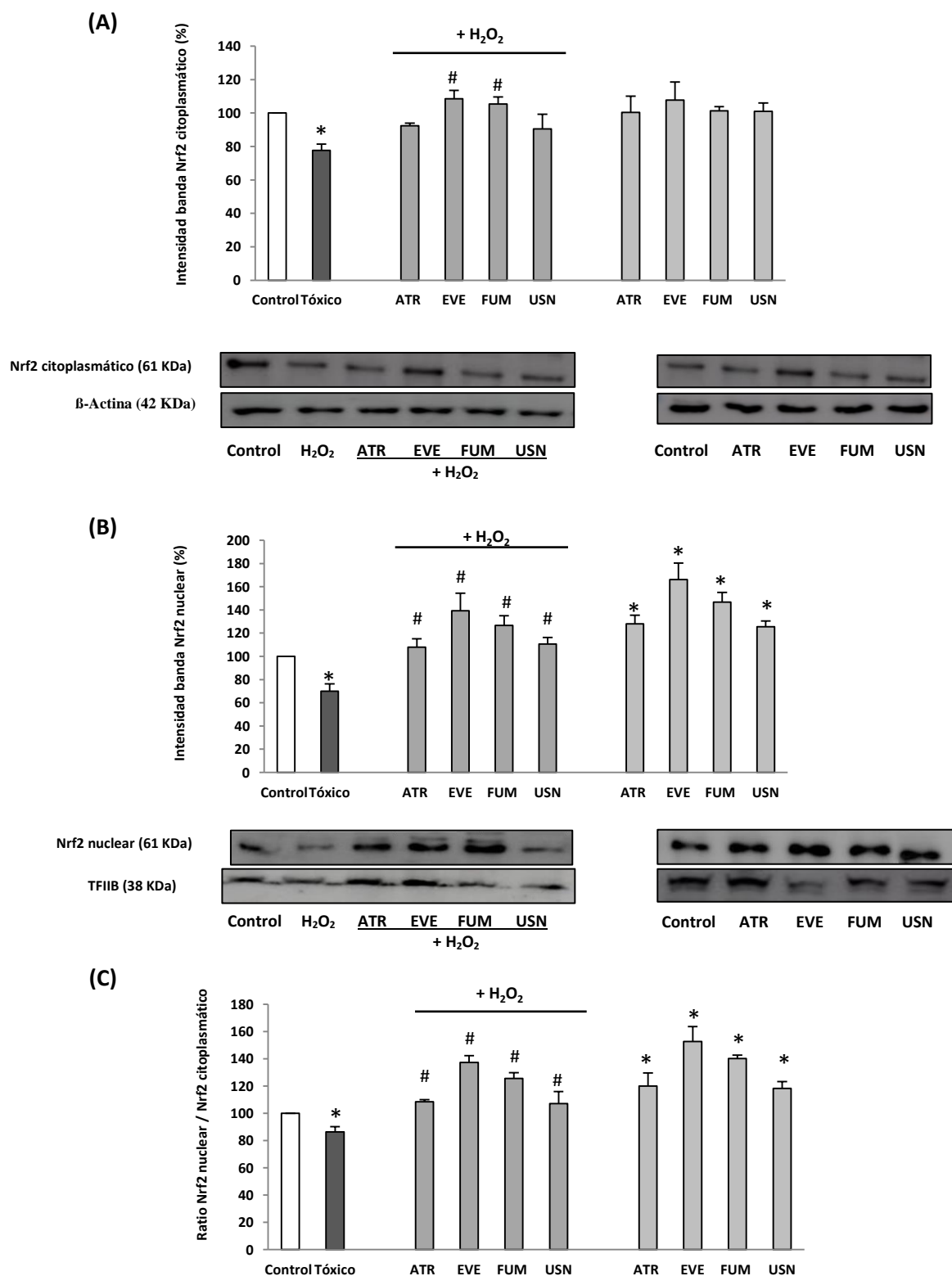


Figura 54. Efecto de los compuestos liquénicos sobre la expresión proteica del factor Nrf2 nuclear y citoplasmático. Las células SH-SY5Y se pre-tratan con los compuestos liquénicos (24h) y/o posterior exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 mM, 30 min). La expresión de proteínas se mide en extractos celulares citoplasmáticos (A) y nucleares (B). β-actina se usa como control de carga de proteína citoplasmática y la proteína de unión a TATA (TFIIB) como control de proteína nuclear. Los resultados se expresan como % de intensidad de la banda (100% en células control). Media ± DE. \*  $p < 0,05$  versus control; #  $p < 0,05$  versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tóxico: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 3.1.7.1.2. Modelo celular U373-MG

El modelo de estrés oxidativo inducido en la línea celular U373-MG (exposición a  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM, 30 min) ejerce efectos similares sobre los niveles y distribución de la proteína Nrf2: reducción significativa de los niveles celulares de expresión proteica tanto en citoplasma como en núcleo, con una mayor reducción en el núcleo (y, por tanto, menor ratio Nrf2 nuclear/citoplasmático). Esto sugiere una menor translocación de la proteína y puede justificar que defectos en esta vía están implicados en la menor expresión de las enzimas antioxidantes. Además, tal y como se aprecia en la Figura 55, los niveles de expresión de la proteína Nrf2 nuclear son mayores en aquellas células pre-tratadas con los metabolitos liquénicos (24 h) respecto a las células sometidas al daño oxidativo por  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Cabe destacar el efecto que ejercen en las células U373-MG los tratamientos con EVE 5  $\mu\text{g/ml}$  y FUM 25  $\mu\text{g/ml}$ , que inducen la expresión de la proteína Nrf2, aumentando sus niveles de forma global, tanto en citoplasma como en núcleo. Favorecen, específicamente, mayores niveles nucleares de Nrf2 (muestran los valores más elevados de ratio Nrf2 nuclear/citoplasmático), lo cual es el requisito esencial para que este factor ejerza su acción en la transcripción de genes. Por tanto, es probable que uno de los mecanismos implicados en la citoprotección demostrada por ambos poliquétidos involucre la activación de esta vía de señalización.

### 3.1.7.2. Actividad de unión al ADN nuclear

Como se mencionó en la Introducción del presente trabajo (apartado 2.2.5.1.), el factor Nrf2 debe unirse al ADN nuclear (en la región ARE) para ejercer su acción como factor regulador de la transcripción génica (previa translocación desde el citoplasma al núcleo). Tras evaluar la actividad de los metabolitos liquénicos para favorecer la translocación y localización nuclear del factor Nrf2, se investiga el grado de actividad de unión al ADN que presenta el factor Nrf2 nuclear bajo los distintos tratamientos. Para ello, se ha realizado un ensayo de ELISA que permite detectar la unión a ADN mediante una lectura espectrofotométrica (kit TransAM). Los resultados se obtienen en unidades de densidad óptica a 450 nm, si bien se han expresado como porcentaje con respecto a células control, en que el factor Nrf2 tiene una adecuada funcionalidad y se unirá a ADN de forma efectiva.

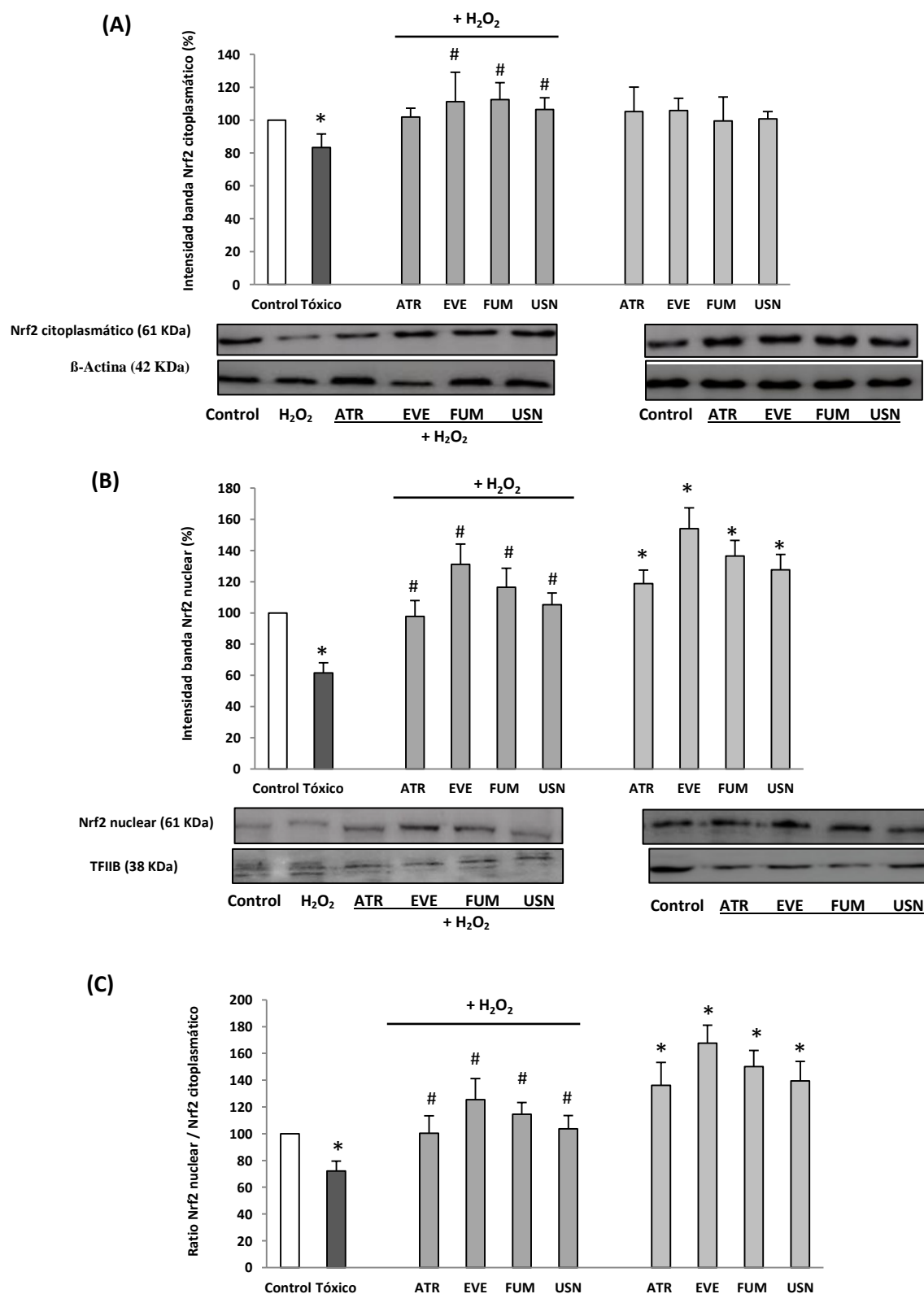


Figura 55. Efecto de los compuestos liquénicos sobre la expresión proteica del factor Nrf2 nuclear y citoplasmático. Las células U373-MG se pre-tratan con los compuestos liquénicos (24h) y/o posterior exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM, 30 min). La expresión de proteínas se mide en extractos celulares citoplasmáticos (A) y nucleares (B). β-actina se usa como control de carga de proteína citoplasmática y la proteína de unión a TATA (TFIIB) como control de proteína nuclear. Los resultados se expresan como % de intensidad de la banda (100% en células control). Media ± DE. \*  $p < 0,05$  versus control; #  $p < 0,05$  versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tóxico: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



### 3.1.7.2.1. Modelo celular SH-SY5Y

Los resultados obtenidos indican que en las células SH-SY5Y expuestas a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,1 mM, 30 min) el factor Nrf2 presente en los extractos nucleares es significativamente menos activo (hasta un 25%) para su unión al ADN en comparación con dicha proteína en células control. El daño oxidativo celular presente en este modelo reduce, por tanto, la capacidad del factor Nrf2 para modular la expresión génica, explicando así la menor expresión de enzimas antioxidantes demostrada previamente en las células sólo tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Los pre-tratamientos con los compuestos liquénicos resultan eficaces en la prevención de ese efecto debido a una posterior exposición a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Así, los pre-tratamientos con ATR, EVE, FUM y USN evitan la pérdida de la actividad para la unión al ADN de la proteína Nrf2 nuclear (Figura 56).

Se demuestra que el tratamiento de las células SH-SY5Y con ATR, FUM y USN (24 h), a las concentraciones que mostraron efectos citoprotectores, mantiene una adecuada capacidad de unión al ADN para el factor Nrf2 nuclear (similar al control). De forma similar, el tratamiento con EVE es, incluso, capaz de mejorar significativamente dicha actividad en comparación con la encontrada en células control.

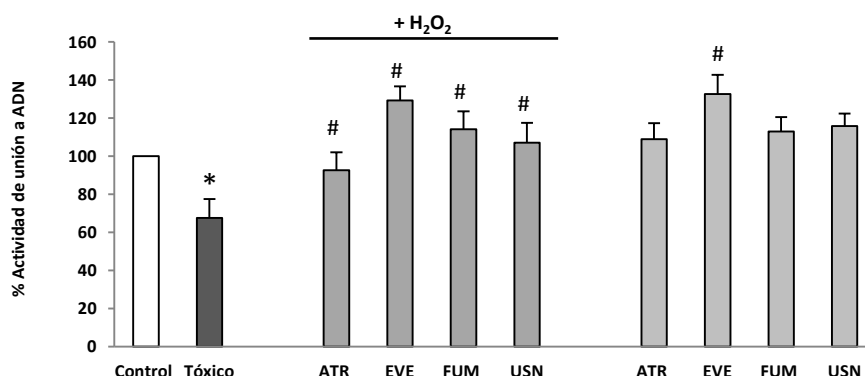


Figura 56. Efecto de los compuestos liquénicos sobre la actividad del factor Nrf2 para la unión al ADN. Las células SH-SY5Y se pre-tratan con los compuestos liquénicos (24 h) y/o posterior exposición a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,1 mM, 30 min). Los resultados de densidad óptica se expresan como porcentaje respecto a las células control (100% de capacidad de unión a ADN). Media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$  versus control; #  $p < 0,05$  versus  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Tóxico:  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### 3.1.7.2.2. Modelo celular U373-MG

En las células U373-MG (modelo de astroglía), el daño oxidativo inducido por  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM, 30 min) disminuye significativamente, aunque en menor medida que en células SH-SY5Y, la capacidad del factor nuclear Nrf2 de unirse al ADN para poder modular la transcripción génica (Figura 57). En este modelo, los pre-tratamientos con los compuestos liquénicos (24 h)

se muestran efectivos para prevenir ese efecto nocivo del estrés oxidativo sobre la actividad de unión al ADN, preservando una adecuada actividad (similar al de células control).

Además, el tratamiento con ácido evérnico 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  es capaz de potenciar la actividad del factor Nrf2 nuclear para unirse al ADN.

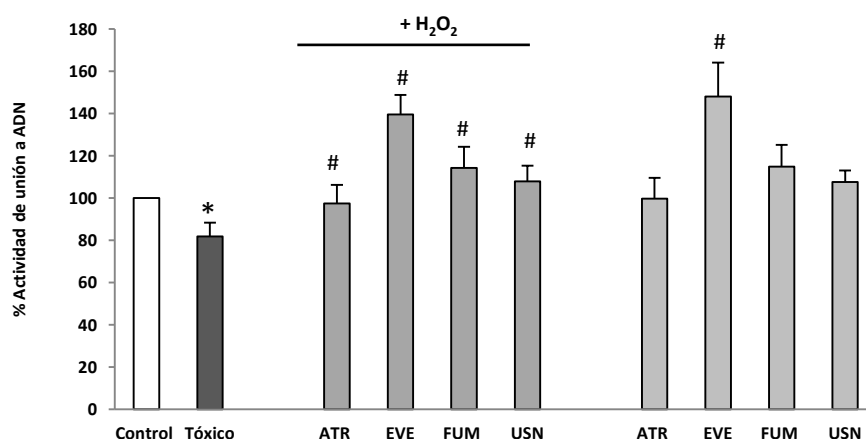


Figura 57. Efecto de los compuestos líquénicos sobre la actividad del factor Nrf2 para la unión al ADN. Las células U373-MG se pre-tratan con los compuestos líquénicos (24 h) y/o posterior exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM, 30 min). Los resultados de densidad óptica se expresan como porcentaje respecto a las células control (100% de capacidad de unión a ADN). Media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$  versus control; #  $p < 0,05$  versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tóxico: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

En general, los resultados obtenidos en los ensayos relacionados con el factor Nrf2 sugieren que dicha vía de señalización intracelular está implicada en la inducción de mayores niveles proteicos de las enzimas antioxidantes estudiadas (CAT, SOD-1, SOD-2, GPx, GR y HO-1) y, por consiguiente, en el efecto citoprotector ejercido por los metabolitos líquénicos frente al estrés oxidativo, tal y como se ha demostrado en los modelos celulares SH-SY5Y y U373-MG en los estudios previos.

### 3.1.8. Estudio de la función mitocondrial

La mitocondria es uno de los orgánulos celulares más especialmente susceptibles al estrés oxidativo, y la afectación por daño oxidativo de las biomoléculas que la conforman puede generar una pérdida de su funcionalidad. Al ser el orgánulo responsable del metabolismo energético, una disfunción mitocondrial altera todos los procesos celulares que requieren de la presencia de ATP, y acentúa el EO por una mayor generación de ERO. Debido a esa estrecha relación, en el presente trabajo se busca evaluar las acciones de los compuestos liquénicos en estudio sobre la función mitocondrial bajo las condiciones experimentales de EO inducido por  $H_2O_2$ . Para ello, se investiga a continuación su efecto sobre ciertos **marcadores bioquímicos** indicadores **de función mitocondrial**.

#### 3.1.8.1. Potencial de membrana mitocondrial

Se ha descrito que la pérdida del potencial de membrana mitocondrial (PMM) ( $\Delta\Psi_m$ ) es uno de los principales eventos que acontecen en las fases iniciales de la disfunción mitocondrial debida a estrés oxidativo. Por ello, en el presente trabajo, se determina el PMM mediante la utilización de la sonda fluorescente TMRM (tetrametilrodamina).

##### 3.1.8.1.1. Modelo celular SH-SY5Y

Los resultados del ensayo fluorimétrico muestran que cuando se induce el daño oxidativo en las células SH-SY5Y por exposición a  $H_2O_2$  (0,1 mM, 30 min), éstas sufren una marcada disipación del PMM, del 43% respecto a las células control, que se refleja en una menor fluorescencia debida a TMRM (de acumulación primordialmente mitocondrial).

En la Figura 58 se muestran los resultados obtenidos en relación a los efectos sobre el PMM de los cuatro metabolitos investigados. Se observa que ningún tratamiento (24 h) con dichos compuestos ejerce una disminución del PMM por sí mismo, manteniéndose valores de PMM normales e iguales a los de células SH-SY5Y control, en las que hay una función mitocondrial normal. Sin embargo, si este tratamiento se hace previo a la inducción de daño oxidativo con  $H_2O_2$ , los compuesto EVE y FUM ejercen, a las concentraciones óptimas (5 y 1  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente), un significativo efecto protector sobre mitocondria, de forma que previenen la caída del PMM que ocurre en las células sólo tratadas con  $H_2O_2$ .

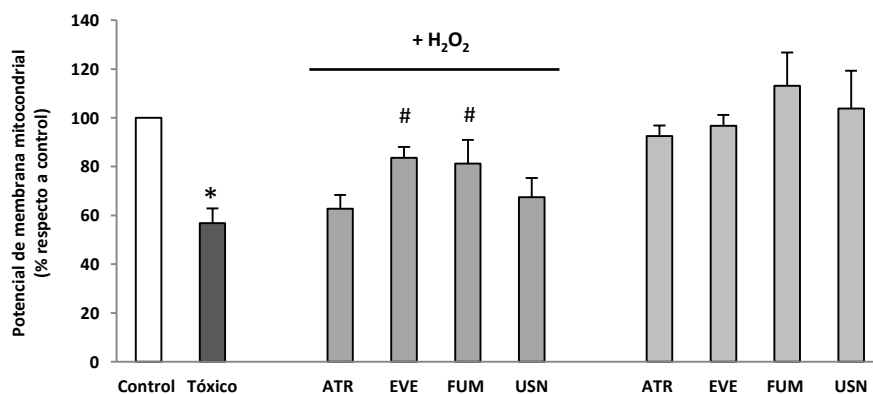


Figura 58. Efecto de los compuestos liquénicos sobre el potencial de membrana mitocondrial. Las células SH-SY5Y se pre-tratan con los compuestos liquénicos (24h) y/o posterior exposición a  $H_2O_2$  (0,1 mM, 30 min). Los resultados del PMM se expresan como porcentaje respecto a las células control (100% de PMM). Media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$  versus control; #  $p < 0,05$  versus  $H_2O_2$ . Tóxico:  $H_2O_2$ .

### 3.1.8.1.2. Modelo celular U373-MG

En las células U373-MG, se observa que el tratamiento con  $H_2O_2$  (1 mM, 30 min) provoca una despolarización mitocondrial con una caída del PMM en torno al 42%, comparando con las células control. Esa disminución de fluorescencia intracelular debida al  $H_2O_2$  se previene mediante un pre-tratamiento con EVE 5  $\mu$ g/ml y FUM 25  $\mu$ g/ml (Figura 59). Ambos tratamientos permiten a las células mantener un PMM similar al de las células control frente a una inducción de EO, lo que sugiere una función mitocondrial normal.

Los resultados de este ensayo indican que los metabolitos liquénicos ácido evérnico y ácido fumarprotocetrárico ejercen un efecto protector sobre la membrana mitocondrial en los dos modelos de células derivadas de SNC utilizados en este trabajo.

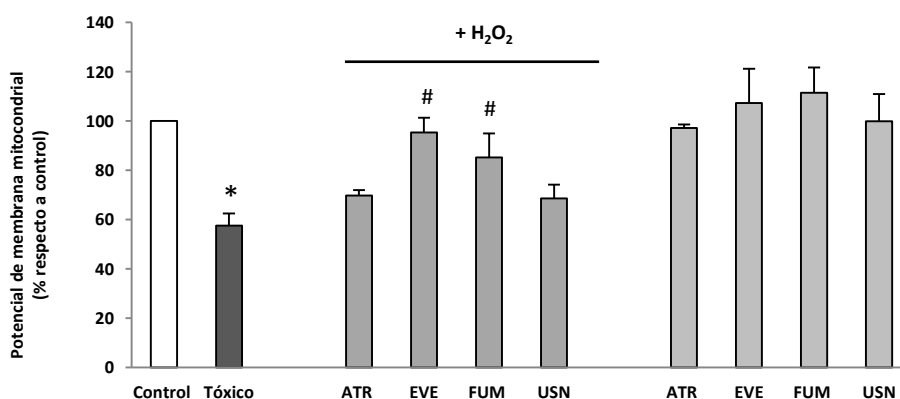


Figura 59. Efecto de los compuestos liquénicos sobre el potencial de membrana mitocondrial. Las células U373-MG se pre-tratan con los compuestos liquénicos (24h) y/o posterior exposición a  $H_2O_2$  (1 mM, 30 min). Los resultados del PMM se expresan como porcentaje respecto a las células control (100% de PMM). Media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$  versus control; #  $p < 0,05$  versus  $H_2O_2$ . Tóxico:  $H_2O_2$ .

### 3.1.8.2. Niveles de calcio mitocondrial

El mantenimiento de una adecuada homeostasis del calcio se ha demostrado clave en numerosos procesos celulares. La funcionalidad normal de la mitocondria es muy importante en el mantenimiento de las concentraciones fisiológicas de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y su distribución citosólica/mitocondrial. Por tanto, tras evaluar el PMM, se miden los efectos de los tratamientos en estudio sobre la capacidad de captación y acumulación de iones  $\text{Ca}^{2+}$  por la mitocondria. El método fluorimétrico se basa en el uso de la sonda fluorescente Rhod-2/AM.

#### 3.1.8.2.1. Modelo celular SH-SY5Y

Los resultados de fluorescencia mitocondrial revelan que las células SH-SY5Y expuestas a la inducción de daño oxidativo por  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,1 mM, 30 min) presentan mayores niveles de calcio mitocondrial (un 80% más que las células control), lo que se correlaciona con la afectación funcional del orgánulo y la pérdida de PMM, demostrada en el apartado anterior.

Los datos recogidos en la Tabla 18 muestran que ninguno de los poliquétidos liquénicos, a las concentraciones y tiempos de tratamiento establecidos, aumentan por sí mismos la captación de calcio por la mitocondria. En cambio, si las células se pre-tratan con esas concentraciones óptimas previamente a la inducción de EO por  $\text{H}_2\text{O}_2$ , los compuestos liquénicos previenen del excesivo incremento en los niveles de calcio mitocondrial. Concretamente, EVE y FUM ejercen un efecto significativamente marcado (mayor para EVE), reduciendo en gran medida el exceso de captación de iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Las células pre-tratadas con ATR y USN también muestran menores niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial, si bien no presentan una diferencia estadísticamente significativa respecto a las células sólo tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

#### 3.1.8.2.2. Modelo celular U373-MG

En la Tabla 18 se recogen también los resultados obtenidos para el modelo de astrogliá. Las células U373-MG tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM, 30 min) muestran un significativo incremento del 43% en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial, en comparación con las células control. Se demuestra, por tanto, que la homeostasis del calcio mitocondrial puede verse afectada por estrés oxidativo también en este modelo celular.

El pre-tratamiento de las células U373-MG con las concentraciones citoprotectoras de EVE y FUM genera una disminución significativa de la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial derivada de la exposición a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , hasta niveles muy similares a los que se encuentran en las células

control. Estos resultados confirman el papel protector frente a la disfunción mitocondrial de estos dos metabolitos liquénicos, confirmando los resultados del apartado anterior.

Ninguno de los compuestos liquénicos ensayados modifica, por sí solos y en tratamientos de 24 h, la capacidad de captación de calcio por la mitocondria, que se mantiene en los niveles basales encontrados en células control.

Tratamiento	Niveles de $\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial (captación relativa a células control)	
	Modelo celular SH-SY5Y	Modelo celular U373-MG
Control	1,00	1,00
$\text{H}_2\text{O}_2$	1,80* $\pm$ 0,26	1,43* $\pm$ 0,12
ATR + $\text{H}_2\text{O}_2$	1,61 $\pm$ 0,16	1,41 $\pm$ 0,13
EVE + $\text{H}_2\text{O}_2$	1,14 <sup>#</sup> $\pm$ 0,06	1,06 <sup>#</sup> $\pm$ 0,05
FUM + $\text{H}_2\text{O}_2$	1,29 <sup>#</sup> $\pm$ 0,07	1,17 <sup>#</sup> $\pm$ 0,06
USN + $\text{H}_2\text{O}_2$	1,54 $\pm$ 0,12	1,30 $\pm$ 0,09
ATR	1,06 $\pm$ 0,01	1,09 $\pm$ 0,08
EVE	0,99 $\pm$ 0,03	0,97 $\pm$ 0,03
FUM	0,95 $\pm$ 0,01	1,01 $\pm$ 0,03
USN	1,04 $\pm$ 0,01	1,01 $\pm$ 0,02

Tabla 18. Efectos sobre los niveles de calcio mitocondrial. Las células SH-SY5Y y U373-MG se tratan con las concentraciones seleccionadas de los compuestos liquénicos y/o con exposición a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 min) a la concentración de 0,1 y 1 mM, respectivamente. Los resultados de fluorescencia se expresan como contenido o captación mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$ , en tanto por 1 relativo a las células control. Media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$  versus control; #  $p < 0,05$  versus  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### 3.1.8.3. Niveles de calcio citosólico

De forma similar a la pérdida del PMM, la alteración de la homeostasis del calcio celular es otra de las señales tempranas del estrés oxidativo, pudiéndose liberar iones  $\text{Ca}^{2+}$  desde sus almacenes intracelulares (p. ej., el retículo endoplasmático). Un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico por EO puede perjudicar y empeorar la función e integridad de las mitocondrias. Por ello, tras cuantificar los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial, medimos el efecto de los distintos tratamientos sobre la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en los dos modelos celulares, mediante el uso del fluoróforo Indo-1/AM.

### 3.1.8.3.1. Modelo celular SH-SY5Y

Tal y como se refleja en la Tabla 19, cuando las células SH-SY5Y se tratan durante 24 h con los cuatro metabolitos liquénicos, los valores de concentración de calcio citosólico que presentan son similares a los de las células control, lo que indica que estos compuestos no alteran la homeostasis celular de iones  $\text{Ca}^{2+}$ .

Por otro lado, la exposición de las células SH-SY5Y a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,1 mM, 30 min) causa un aumento muy significativo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, elevando (y casi quintuplicando) la concentración citosólica que se observa en las células control. Cuando las células son pre-tratadas con los compuestos liquénicos en estudio, muestran una inhibición significativa de la elevación de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, con la excepción de atranorina. El efecto más potente observado corresponde a EVE 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , que reduce a más de la mitad la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (respecto a las células sólo tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), seguido de FUM 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y USN 2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , en ese orden.

### 3.1.8.3.2. Modelo celular U373-MG

La Tabla 19 recoge también los resultados del ensayo fluorimétrico de medida de calcio citosólico para las células U373-MG. Éstas muestran, de forma similar al modelo neuronal, un marcado incremento de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico cuando se tratan con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM, 30 min), presentando niveles de 324,9 nM frente a 76,4 nM en células control. Cuando las células se tratan (24 h) con los compuestos liquénicos en estudio, previamente a la exposición a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico se ve significativamente reducida. Cabe destacar el efecto de los pre-tratamientos con EVE y FUM, que reducen a la mitad los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (150,5 nM y 164,0 nM, respectivamente) respecto de las células sólo expuestas a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En comparación con ellos, el efecto demostrado por ATR y USN es más moderado.

En células tratadas únicamente con los poliquétidos liquénicos no se aprecian cambios significativos del calcio citosólico, que se mantiene en niveles semejantes a los observados en estado basal, lo cual confirma que dichos compuestos no alteran la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ .

Tratamiento	Niveles de $\text{Ca}^{2+}$ citosólico (concentración en nM)	
	Modelo celular SH-SY5Y	Modelo celular U373-MG
Control	67,40 ± 7,33	76,44 ± 7,03
$\text{H}_2\text{O}_2$	314,07* ± 40,52	324,87* ± 13,80
ATR + $\text{H}_2\text{O}_2$	302,24 ± 38,35	279,79 <sup>#</sup> ± 16,61
EVE + $\text{H}_2\text{O}_2$	151,97 <sup>#</sup> ± 22,64	150,49 <sup>#</sup> ± 3,04
FUM + $\text{H}_2\text{O}_2$	199,80 <sup>#</sup> ± 26,56	164,03 <sup>#</sup> ± 9,94
USN + $\text{H}_2\text{O}_2$	248,76 <sup>#</sup> ± 29,69	209,91 <sup>#</sup> ± 30,79
ATR	76,49 ± 9,92	90,61 ± 10,96
EVE	66,82 ± 8,01	71,53 ± 6,53
FUM	82,20 ± 7,36	65,02 ± 9,87
USN	68,18 ± 10,27	68,68 ± 4,96

Tabla 19. Efectos sobre los niveles de calcio citosólico. Las células SH-SY5Y y U373-MG se tratan con las concentraciones seleccionadas de los compuestos liquénicos y/o con exposición a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 min) a la concentración de 0,1 y 1 mM, respectivamente. Los resultados de fluorescencia se expresan como concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, en nanomolar. Media ± DE. \*  $p < 0,05$  versus control; #  $p < 0,05$  versus  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### 3.1.9. Estudio de los efectos sobre la apoptosis

Tal y como se expuso en la Introducción, la muerte celular que acontece en el SNC como consecuencia del estrés oxidativo se produce fundamentalmente por mecanismos de apoptosis; además, cobra especial relevancia la vía intrínseca de la apoptosis mediada por mitocondria. Por tanto, existe una estrecha relación entre la disfunción mitocondrial generada por EO y la apoptosis. En esta línea, tras evaluar parámetros de EO y de disfunción mitocondrial, se pretende determinar el efecto de los compuestos liquénicos sobre ciertos **marcadores de apoptosis**.

#### 3.1.9.1. Actividad de la enzima caspasa-3

La enzima caspasa-3 es la principal enzima efectora de la apoptosis y en la que confluyen las vías intrínseca y extrínseca de dicho proceso. Se ha medido la actividad de esta enzima como indicador del nivel de apoptosis celular. Para ello, se utiliza el sustrato específico fluorogénico Ac-DEVD-AMC, y la actividad se determina por fluorimetría.



### 3.1.9.1.1. Modelo celular SH-SY5Y

En la Figura 60, se muestra que el tratamiento durante 24 h de las células SH-SY5Y con los compuestos liquénicos en estudio no afecta a la actividad caspasa-3, en comparación con las células control. Así, se verifica que los compuestos en estudio no inducen apoptosis por sí mismos (a las concentraciones seleccionadas).

Por otro lado, la inducción de daño oxidativo en las células SH-SY5Y por exposición a  $H_2O_2$  (0,1 mM, 30 min) genera un incremento significativo de los niveles de actividad caspasa-3 (un 173% superior en comparación con las células control), que sugiere que la muerte celular en este modelo neuronal se produce principalmente por apoptosis. En cambio, si las células SH-SY5Y se pre-tratan (24 h) con los diferentes poliquétidos, la actividad de la enzima caspasa-3 se ve significativamente inhibida en, al menos, un 80%. La efectividad de estos compuestos frente el aumento de actividad enzimática debido a  $H_2O_2$  disminuye en el siguiente orden: EVE > FUM > USN > ATR. Destaca, entre ellos, el pre-tratamiento con EVE, que revierte completamente la situación generada por  $H_2O_2$  hasta los niveles basales de actividad enzimática en células control.

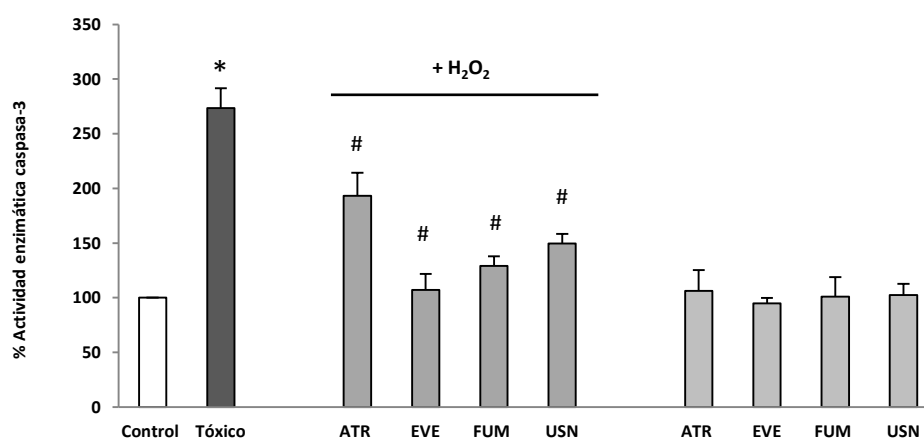


Figura 60. Efecto sobre la actividad de la enzima caspasa-3. Las células SH-SY5Y se incuban con los compuestos liquénicos (24 h) y/o con  $H_2O_2$  (0,1 mM, 30 min). La actividad caspasa-3 se determina en extractos celulares totales por fluorimetría. Los resultados se expresan como % respecto a las células control sin tratar (100% de actividad enzimática). Media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$  versus control; #  $p < 0,05$  versus  $H_2O_2$ . Tóxico:  $H_2O_2$ .

### 3.1.9.1.2. Modelo celular U373-MG

De forma similar, se ha estudiado el efecto de los diferentes tratamientos sobre la actividad de la enzima caspasa-3 en células U373-MG (modelo de astrogliá). Los resultados, recogidos en la Figura 61, reflejan que la exposición de las células U373-MG a  $H_2O_2$  (1 mM, 30 min) induce una mayor muerte celular por apoptosis, incrementando la actividad de la enzima

caspasa-3 hasta en un 200%, si se compara con la actividad basal en células control. Observamos en este modelo que un pre-tratamiento con los cuatro metabolitos liquénicos atenúa significativamente la mayor actividad enzimática inducida por la posterior exposición a  $H_2O_2$ , sugiriendo que los efectos citoprotectores de estos compuestos son debidos, en parte, a un efecto anti-apoptótico.

El tratamiento de las células U373-MG con los compuestos solos no provoca variaciones significativas de la actividad enzimática (en comparación con las células control), lo que indica que estos compuestos no inducen por sí solos activación del proceso de apoptosis, bajo las condiciones experimentales establecidas.

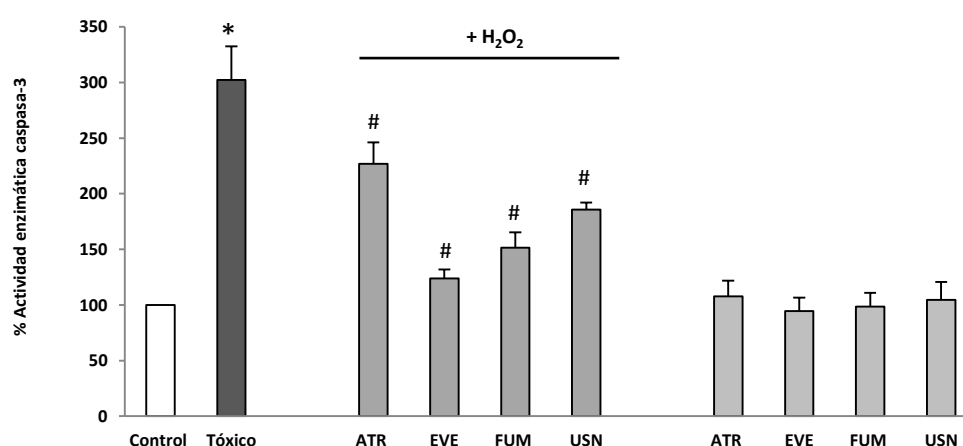


Figura 61. Efecto sobre la actividad de la enzima caspasa-3. Las células U373-MG se incuban con los compuestos liquénicos (24 h) y/o con  $H_2O_2$  (1 mM, 30 min). La actividad caspasa-3 se determina en extractos celulares totales por fluorimetría. Los resultados se expresan como % respecto a las células control sin tratar (100% de actividad enzimática). Media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$  versus control; #  $p < 0,05$  versus  $H_2O_2$ . Tóxico:  $H_2O_2$ .

### 3.1.9.2. Marcadores de apoptosis

Una vez realizada la medida de la actividad enzimática caspasa-3, se han determinado por Western blot los niveles de expresión de algunas proteínas involucradas en la regulación del proceso de apoptosis. En primer lugar, y para confirmar los resultados obtenidos en el apartado anterior, se miden los niveles de la proteína caspasa-3 en su forma activada. Además, se ha evaluado la expresión proteica de dos factores reguladores de apoptosis como la proteína pro-apoptótica BAX y la proteína anti-apoptótica Bcl-2; ambas forman parte de la gran familia de proteínas Bcl-2, que regulan procesos de permeabilización mitocondrial y constituyen un punto clave en la vía intrínseca de la apoptosis celular.

### 3.1.9.2.1. Modelo celular SH-SY5Y

Como consecuencia de la inducción de daño oxidativo por  $H_2O_2$  (0,1 mM, 30 min), se demuestra que las células SH-SY5Y presentan niveles significativamente elevados de proteína caspasa-3 activa, que están en consonancia con los resultados de actividad obtenidos en el punto anterior (ensayo fluorimétrico). Además, las células expuestas a  $H_2O_2$  presentan un significativo incremento de la expresión de la proteína pro-apoptótica BAX y disminución de la proteína anti-apoptótica Bcl-2, en comparación con células control sin tratar. Todo ello confirma la inducción de apoptosis en el modelo de EO utilizado en el presente trabajo.

Tal y como se recoge en la Figura 62, los tratamientos con ATR, EVE, FUM y USN (24 h) no generan ninguna modificación significativa de los niveles de expresión proteica de las tres proteínas evaluada. Así, se confirma la no inducción de la apoptosis en células SH-SY5Y por parte de los metabolitos liquénicos (a las concentraciones óptimas seleccionadas).

Cuando el tratamiento con los compuestos (24 h) es previo a la inducción de daño oxidativo por  $H_2O_2$ , sí que se observan efectos estadísticamente significativos. Los cuatro compuestos revierten los efectos generados por  $H_2O_2$  sobre los tres marcadores proteicos aquí determinados, atenuando el incremento en los niveles de proteína caspasa-3 activa y de BAX, y previniendo la reducción en la expresión proteica de Bcl-2. Los efectos más marcados se observan en el grupo de células pre-tratadas con EVE 5  $\mu\text{g/ml}$ , que es capaz de mantener una expresión elevada de Bcl-2, y de revertir el incremento de caspasa-3 activa y BAX hasta niveles similares a los de células control, previniendo de forma casi completa la inducción de la apoptosis por daño oxidativo. El segundo pre-tratamiento más activo es FUM 1  $\mu\text{g/ml}$ , seguido de USN 1  $\mu\text{g/ml}$ ; ATR también ejerce efectos estadísticamente significativos, si bien resultan más moderados.

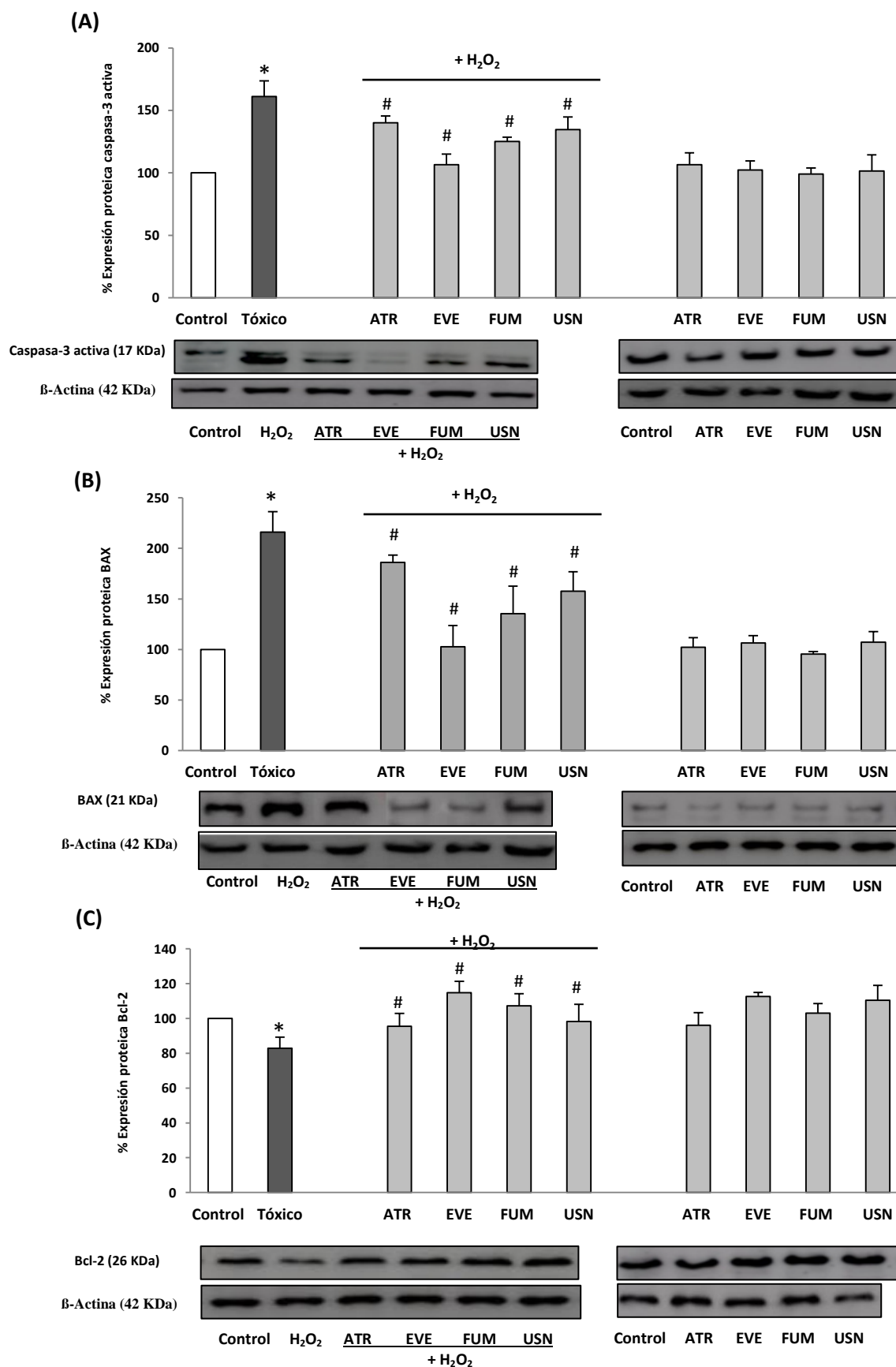


Figura 62. Efecto sobre la expresión proteica de marcadores de apoptosis. Las células SH-SY5Y se tratan con los compuestos liquénicos (24 h) y/o con posterior exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 mM, 30 min). Las proteínas caspasa-3 activa (A), BAX (B) y Bcl-2 (C) se determinan en extractos celulares totales por Western blot. Los resultados se expresan como % de expresión respecto a las células control sin tratar (100% de expresión proteica). Media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$  versus control; #  $p < 0,05$  versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tóxico: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 3.1.9.2.2. Modelo celular U373-MG

Seguidamente, se evalúa el efecto de los tratamientos sobre los marcadores de apoptosis en las células U373-MG. En el caso de células expuestas a  $H_2O_2$  (1 mM, 30 min), se aprecian efectos similares a los presentes en células SH-SY5Y, con un patrón de modificación de los marcadores proteicos en el mismo sentido: aumento de los niveles de caspasa-3 activa y BAX, y menor expresión de Bcl-2, en comparación con células control. Estos resultados demuestran que la apoptosis también juega un papel importante en la citotoxicidad ejercida por  $H_2O_2$  en este modelo de astrogliá (demostrada en el punto 1.2.3.1.2. de la presente sección).

Tal y como se refleja en la Figura 63, los pre-tratamientos con los compuestos liquénicos (24 h) ejercen un efecto anti-apoptótico que permite atenuar significativamente, e incluso prevenir totalmente en algunos casos, las alteraciones del perfil proteico de las células U373-MG expuestas a  $H_2O_2$ . Por ejemplo, respecto a la caspasa-3 activa, todos los pre-tratamientos atenúan el incremento en los niveles proteicos de la enzima, con una efectividad en el orden: EVE > FUM > USN > ATR. El pre-tratamiento con EVE 5  $\mu$ g/ml revierte totalmente los cambios debidos a  $H_2O_2$  y se encuentran niveles iguales a los de células control. Con respecto a la proteína pro-apoptótica BAX, el pre-tratamiento con los compuestos EVE, FUM y USN (a las concentraciones óptimas seleccionadas, 24 h) disminuye significativamente la elevación de los niveles proteicos, en comparación con las células sólo tratadas con  $H_2O_2$ . Por último, se observa que los tratamientos con los compuestos liquénicos, previamente a la inducción de daño oxidativo, son capaces de atenuar significativamente la depleción celular de Bcl-2; destaca la mayor efectividad mostrada por EVE y FUM, mientras que los efectos de USN y ATR son más moderados respecto a esta proteína.

En la Figura 63 se recogen también los tratamientos (24 h) con los poliquétidos liquénicos solos, que no modifican significativamente ninguno de los marcadores de la apoptosis, si se compara con las células control sin tratar.

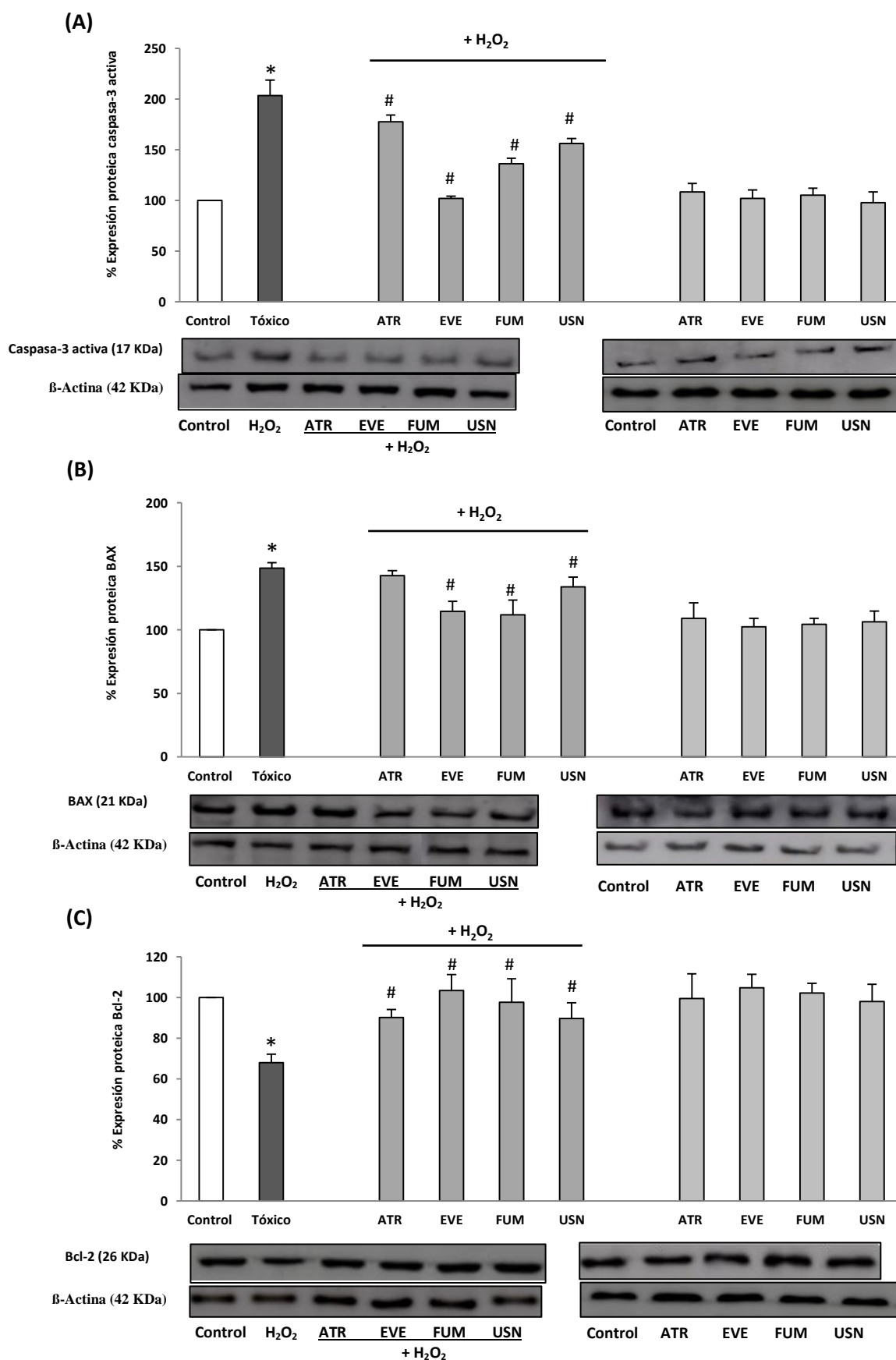


Figura 63. Efecto sobre la expresión proteica de marcadores de apoptosis. Las células U373-MG se tratan con los compuestos liquénicos (24 h) y/o con posterior exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM, 30 min). Las proteínas caspasa-3 activa (A), BAX (B) y Bcl-2 (C) se determinan en extractos celulares totales por Western blot. Los resultados se expresan como % de expresión respecto a las células control sin tratar (100% de expresión proteica). Media ± DE. \*  $p < 0,05$  versus control; #  $p < 0,05$  versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tóxico: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 3.1.10. Estudio del mecanismo de autofagia

Tal y como se ha avanzado en la sección de Revisión Bibliográfica (apartado 2.4.2.), la autofagia representa un mecanismo intracelular de vital importancia en el reciclaje de moléculas dañadas, y se presenta recientemente como diana en estudios de neuroprotección. Resulta clave en la eliminación de biomoléculas degradadas por EO, y está estrechamente relacionada con la disfunción mitocondrial por ser el único mecanismo de reciclaje de mitocondrias disfuncionales enteras. Tras evaluar la incidencia de los tratamientos sobre los marcadores de disfunción mitocondrial y apoptosis, iniciamos el estudio del **flujo de autofagia** en el modelo neuronal de EO, así como del efecto de los compuestos liquénicos sobre él.

Con este fin, se utiliza la técnica de Western blot para la cuantificación de los niveles intracelulares de dos proteínas involucradas en la activación de la autofagia y, en concreto, de la formación de las vesículas autofagosomales. Estas proteínas son las dos isoformas de LC-3 (proteína de cadena ligera-3 asociada a microtúbulos): LC3-I (isoforma inactiva en citosol) y LC3-II (isoforma activada por conjugación a fosfatidiletanolamina y asociada a la membrana del autofagosoma). Cabe destacar que, a pesar de que LC3-II tiene un mayor peso molecular que LC3-I, su carácter lipídico le permite migrar más en el gel de poliacrilamida, de manera que se observa su banda más abajo que la de LC3-I, como si tuviera un menor peso molecular. El contenido citosólico de LC3-II (normalizado frente al control de carga  $\beta$ -actina) permite estimar el estado del flujo autofágico en un momento puntual (Mizushima y Yoshimori, 2007). Puesto que la inducción de la autofagia puede acontecer en períodos de tiempo inferiores a 24 h, en este ensayo se han determinado los niveles de ambas proteínas a las 6 h y a las 24 h de tratamiento con las concentraciones óptimas seleccionadas de los compuestos liquénicos, con exposición o no a  $H_2O_2$  (0,1 mM, 30 min), y tanto en presencia como en ausencia de un inhibidor del flujo autofágico (mezcla compuesta por  $NH_4Cl$  10 mM y leupeptina 100  $\mu M$ ).

#### 3.1.10.1. Modelo celular SH-SY5Y

La inducción de la autofagia se ha estimado en las células SH-SY5Y (modelo neuronal), por considerar que las neuronas constituyen la unidad funcional del SNC donde la modulación de este mecanismo tiene más relevancia, consecuencia de su mayor sensibilidad en situaciones de EO (entre otros factores). Los resultados de la expresión de proteínas en este modelo se expresan como **ratio LC3-II/ $\beta$ -actina**, por considerarse la forma más correcta de expresar los datos en inmunoblot de LC3 (Mizushima y Yoshimori, 2007) y como porcentaje relativo a células control (100% del ratio).

En la Figura 64, se muestran los resultados obtenidos para las células SH-SY5Y tratadas con los compuestos solos a las concentraciones en estudio (Figura 64A) y para aquéllas pre-tratadas con los compuestos y posteriormente expuestas a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,1 mM, 30 min) (Figura 64B). Ambas gráficas muestran la expresión proteica en ausencia y en presencia de inhibidor.

De forma general, se observa que, en ausencia del inhibidor de autofagia, la banda de la proteína LC3-II tiene menor intensidad respecto a la banda LC3-I, lo que se explica por el hecho de que la LC3-II se degrada una vez que los autofagosomas se fusionan con los lisosomas. Sin embargo, cuando se inhiben las fases finales del flujo autofágico con  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , los niveles de LC3-II son mayores respecto a los de LC3-I, ya que LC3-I se sigue transformando a LC3-II por inducción del inicio del proceso de autofagia, pero los autofagosomas no se fusionan con los lisosomas; por tanto, LC3-II no se degrada y sus niveles son también mayores (Tanida y col., 2008). Así, mayores niveles de LC3-II y mayores valores del ratio LC3-II/ $\beta$ -actina en presencia del inhibidor indican una efectiva activación/inducción de las fases iniciales de la autofagia.

Se observa que, en tratamientos de 6 h, el único compuesto efectivo para potenciar la actividad autofágica celular es el ácido evérnico (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), que es capaz de incrementar los niveles de LC3-II en presencia e incluso en ausencia de inhibidor. En cambio, en tratamientos de 24 h, todos los compuesto elevan significativamente el ratio LC3-II/ $\beta$ -actina en presencia de inhibidor de autofagia, lo que indica que existe un mayor contenido de LC3-II, que no se detecta en ausencia de inhibidor (porque se degrada). Estos resultados sugieren que los compuestos actúan induciendo un mayor flujo autofágico. Los resultados más prometedores los presentan EVE y FUM (24 h, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectivamente), que son capaces de inducir el flujo autofágico en más de un 200% si se compara con las células control.

Por otro lado, los resultados de expresión proteica muestran que el daño oxidativo inducido por  $\text{H}_2\text{O}_2$  genera, en presencia del inhibidor del flujo autofágico, un incremento significativo del 20% de la proteína LC3-II (forma activada de la proteína LC3). Esto indica que, bajo la situación de estrés oxidativo, hay cierta activación del flujo autofágico, que es mayor que en las células SH-SY5Y control sin tratar. Se favorece la formación de autofagosomas que engloban a las moléculas dañadas por EO para su posterior reciclaje.

El pre-tratamiento (24 h) de las células SH-SY5Y con las concentraciones óptimas de los metabolitos liquénicos, previo a la exposición a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , permite observar que los compuestos EVE y FUM actúan como efectivos inductores de autofagia en situaciones de estrés oxidativo (Figura 64B). Ambos compuestos dan lugar a un ratio LC3-II/ $\beta$ -actina superior en aprox. un 50% al de células control y un 30% superior al de las células expuestas únicamente a  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



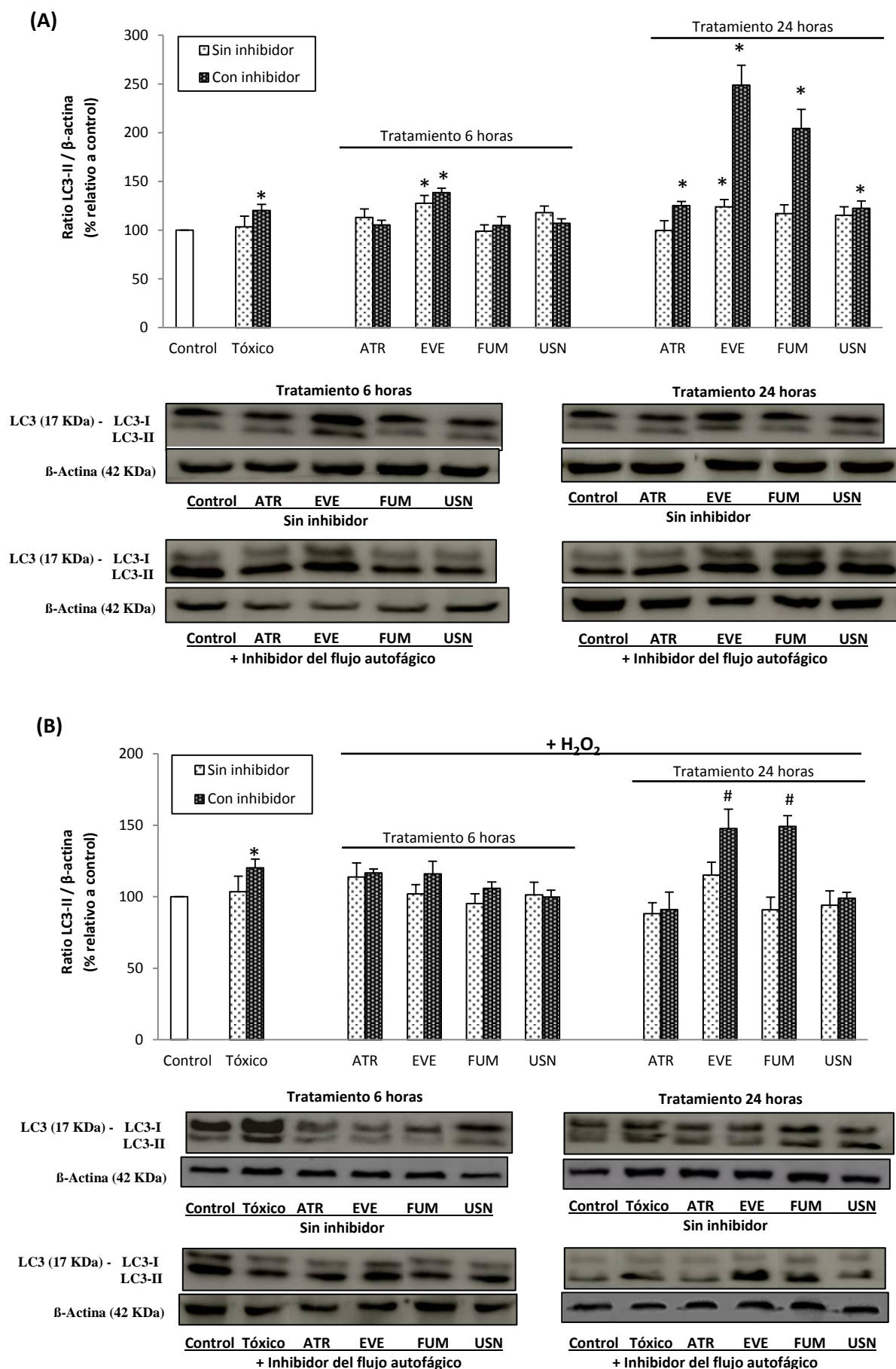


Figura 64. Efecto de los distintos tratamientos celulares sobre la expresión proteica de LC3-I y LC3-II, como marcadores del flujo autofágico. (A) Células SH-SY5Y tratadas sólo con las concentraciones óptimas de los compuestos liquénicos. (B) Células SH-SY5Y tratadas con las concentraciones óptimas de los compuestos liquénicos y posterior exposición a  $H_2O_2$  (0,1 mM, 30 min). Los resultados se expresan como ratio LC3-II/ $\beta$ -actina en % respecto a las células control sin tratar (100% de expresión proteica). Media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$  versus control; #  $p < 0,05$  versus  $H_2O_2$ . Tóxico:  $H_2O_2$ .

### 3.2. Estudios de barrera hematoencefálica

Una vez finalizado el estudio del potencial neuroprotector de los cuatro metabolitos de líquenes, se busca determinar su **capacidad para atravesar la BHE**, que supone un requisito indispensable para cualquier fármaco cuya diana terapéutica se halle en el SNC. Con este fin, se han realizado estudios *in vitro* con dos líneas celulares y estudios *in silico*, cuyos resultados se detallan a continuación.

#### 3.2.1. Propiedades moleculares de los metabolitos liquénicos

El estudio *in silico* tiene como objetivo predecir el perfil farmacocinético de las moléculas en estudio basándonos en sus propiedades físico-químicas y ciertos descriptores moleculares directamente relacionados con el paso de moléculas a través de la BHE. Tal y como se describe en el apartado 2.5.1. de Material y Métodos, para ello se han utilizado distintos recursos computacionales, como ALOGPS 2.1., Daylight Chemical y Molinspiration.

Estructuralmente, los metabolitos liquénicos estudiados presentan naturaleza de poliquétidos, diferenciándose en el número y tipo de ciclos que los conforman. Atranorina y ácido evérnico presentan estructura de depsidas, con dos anillos bencénicos unidos por un enlace éster y con distintos sustituyentes en cada uno de ellos. El ácido fumarprotocetrárico presenta una estructura de depsidona, derivada de la estructura de depsida pero con presencia de un tercer heterociclo entre los anillos aromáticos y, además, una cadena lateral sobre uno de los bencenos con un grupo ácido y 5 unidades de carbono, que confieren un mayor volumen a la molécula. Por último, el ácido úsnico presenta una estructura de dibenzofurano. Muestran diferentes sustituyentes laterales (p. ej., ácidos carboxílicos), pero todas las moléculas presentan entre ellos, al menos, dos hidroxilos fenólicos. Las diferencias estructurales determinan diferencias en las propiedades físico-químicas de las moléculas, tal y como se recoge en la Tabla 20.

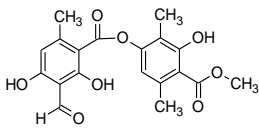
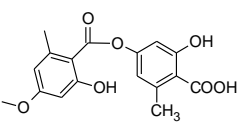
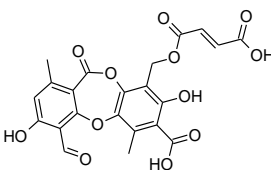
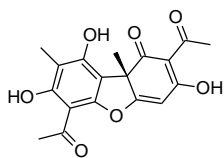
Compuesto	Atranorina	Ácido evérnico	Ácido fumarprotocetrárico	Ácido úsnico
Estructura química				
Fórmula	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>22</sub> H <sub>16</sub> O <sub>12</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>
Peso molecular (g/mol o Da)	374,34	332,30	472,35	344,31
Log P <sub>oct</sub>	3,55	3,68	2,31	2,77
Log P <sub>oct</sub> / Peso molecular	0,0068	0,0096	0,0049	0,0080
TPSA (Å)	130,36	113,29	201,78	117,97
HA (O + N)	8	7	12	7
HD (OH + NH)	3	3	4	2
Enlaces rotables	6	5	7	2

Tabla 20. Propiedades físico-químicas y descriptores moleculares de los metabolitos liquénicos. Log P: logaritmo del coeficiente de partición octanol/agua; TPSA: área topológica de la superficie polar; HA: grupos aceptores de enlaces de hidrógeno; HD: grupos donadores de enlaces de hidrógeno.

Todos los poliquétidos estudiados tienen pesos moleculares relativamente bajos (menores de 375 Da), a excepción del ácido fumarprotocetrárico que presenta el mayor peso molecular (472 Da). El ácido evérnico es el compuesto de menor peso molecular, seguido de ácido úsnico y atranorina. Podemos establecer que, *a priori*, estos pesos moleculares, que no son muy elevados (< 500 Da), no supondrían un impedimento en su capacidad de paso a través de BHE.

Los valores de Log P, como un descriptor muy comúnmente utilizado para estimar la lipofilia de una molécula, varían en los distintos compuestos entre 2,31 y 3,68, siendo estos límites los valores correspondientes a ácido fumarprotocetrárico y ácido evérnico, respectivamente. Ácido úsnico y atranorina presentan valores de Log P intermedios (2,77 y 3,55, respectivamente), que sugieren valores de lipofilia intermedios. Un mayor coeficiente de reparto Log P supone una mayor hidrofobicidad/lipofilia de la molécula. La lipofilia determina el paso de las moléculas a través de las bicapas lipídicas celulares, y condiciona el proceso de transporte por difusión pasiva; en general, a mayor lipofilia, mayor facilidad de paso a través

de la BHE. Pero valores demasiado elevados de lipofilia pueden tener el efecto contrario, puesto que la molécula puede quedar retenida en la BHE o ser expulsado por transportadores eflujo como la glicoproteína-p (Banks, 2009).

El área topológica de la superficie polar (TPSA) de las cuatro moléculas varía en el siguiente orden creciente: ácido evérnico (113,3 Å) < ácido úsnico (117,9 Å) < atranorina (130,4 Å) < ácido fumarprotocetrárico (201,8 Å). En principio, valores más bajos de TPSA pueden facilitar la difusión a través de BHE.

El ácido fumarprotocetrárico es la molécula que presenta un mayor número de grupos aceptores y donadores de enlaces de hidrógeno (12 y 4, respectivamente), seguido de atranorina (8 y 3), ácido evérnico (7 y 3) y ácido úsnico (7 y 2). Con respecto al número de enlaces rotables, que determinan la conformación espacial, el ácido fumarprotocetrárico presenta 7; atranorina, 6; ácido evérnico, 5; y ácido úsnico, 2.

De forma general, una elevada flexibilidad conformacional (definida por el número de enlaces rotables), un elevado potencial de la molécula para adherirse a los iones de hidrógeno (a mayor capacidad, menor captación de las moléculas por las células endoteliales) y una elevada TPSA restringen la entrada de compuestos en el SNC.

Por tanto, teniendo en cuenta los valores obtenidos para estos parámetros en el estudio *in silico*, así como los estudios previos donde se relacionan sus valores y la capacidad de atravesar la BHE, se puede considerar que el perfil farmacocinético de los poliquétidos liquénicos podría ser adecuado para atravesar la BHE por mecanismos de difusión pasiva. Concretamente, destacan las propiedades más favorables que presenta el ácido evérnico y más desfavorables del ácido fumarprotocetrárico.

### 3.2.2. Captación por células endoteliales

Tras predecir las propiedades físico-químicas que estiman el potencial comportamiento farmacocinético de las moléculas, se procede con ensayos experimentales *in vitro* que permitan verificar la aproximación bioinformática. El objetivo de estos estudios es caracterizar la capacidad de los compuestos en estudio para atravesar la BHE por difusión pasiva y, por tanto, alcanzar el SNC.

En primer lugar, se utiliza la línea celular RBE4 como modelo de células endoteliales de cerebro, con el fin de analizar la captación de los compuestos liquénicos por el endotelio

vascular cerebral. El protocolo de trabajo se describe en el apartado 2.5.2. de Material y Métodos.

Como paso previo a este estudio *in vitro*, se evalúa si los compuestos ejercen citotoxicidad sobre las células endoteliales RBE4 mediante el ensayo de reducción de MTT (descrito en el apartado 2.4.1.1. de Material y Métodos). Para ello, esta línea celular se incubaba durante 24 h (tiempo máximo de tratamiento en este ensayo) con la concentración más alta ensayada de los distintos compuestos aislados (5  $\mu\text{g/ml}$ ). Los resultados evidencian que ninguno de los compuestos en estudio produce cambios significativos de la viabilidad de las células RBE4 en comparación con las células control (Figura 65). Se asume que concentraciones y/o tiempos de incubación inferiores tampoco afectarán a la viabilidad de estas células.

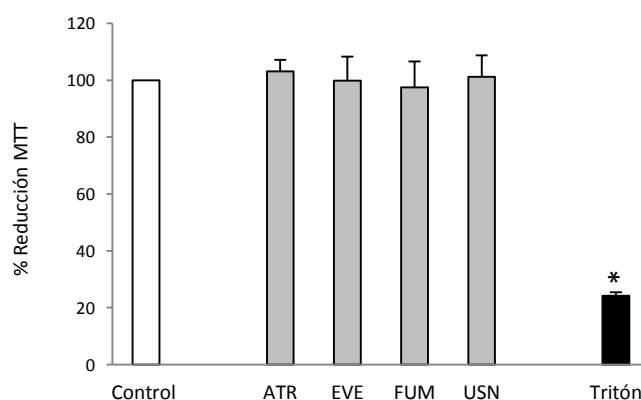


Figura 65. Resultados de viabilidad celular de la línea celular RBE4. Las células se tratan con los cuatro compuestos aislados a la concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$  durante 24 h. La reducción de MTT se expresa como % respecto al control (100% de viabilidad). Los resultados se expresan como media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$  versus control.

La captación de los distintos compuestos liquénicos por las células RBE4 se analiza midiendo la concentración intracelular de los mismos por HPLC, según las condiciones establecidas previamente (apartado 2.1.3. de Material y Métodos). Las células se incuban durante 4 tiempos (0,5, 6, 18 y 24 h) y con tres concentraciones distintas de cada compuesto (1, 2,5 y 5  $\mu\text{g/ml}$ ). Los resultados obtenidos (representados en la Figura 66) muestran que la captación de los cuatro poliquétidos por las células endoteliales es dependiente de la concentración y del tiempo, observándose las máximas concentraciones intracelulares de los compuestos a las 24 h de incubación con la concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$ .

De forma general, a los 30 min de incubación con los compuestos, las células RBE4 incorporan cantidades muy pequeñas de los compuestos. El contenido intracelular comienza a ser más significativo tras 6 h de tratamiento. Cuando las células RBE4 se tratan con los compuestos liquénicos a las concentraciones de 1 y 2,5  $\mu\text{g/ml}$  no se detectan niveles

cuantificables a los 30 min de tratamiento. Las incubaciones con los compuestos a 5  $\mu\text{g/ml}$  son las que proporcionan los mayores niveles intracelulares de cada uno de ellos, que sí son detectables desde los 30 min de tratamiento.

El compuesto que presenta una mayor capacidad de penetración en las células RBE4 es el ácido evérnico, mientras que atranorina es el compuesto menos captado por las mismas. Los ácidos fumarprotocetrárico y úsnico presentan una captación similar, intermedia entre atranorina y ácido evérnico. Así, si se compara la captación a la mayor concentración (5  $\mu\text{g/ml}$ ) y mayor tiempo de incubación (24 h), cabe destacar que el ácido evérnico tiene una concentración intracelular de 146,54 ng/mg proteína. El segundo compuesto con mayor captación es el ácido úsnico con 35,45 ng/mg proteína, seguido de ácido fumarprotocetrárico con 28,69 ng/mg proteína y atranorina con 8,48 ng/mg proteína (Figura 66).

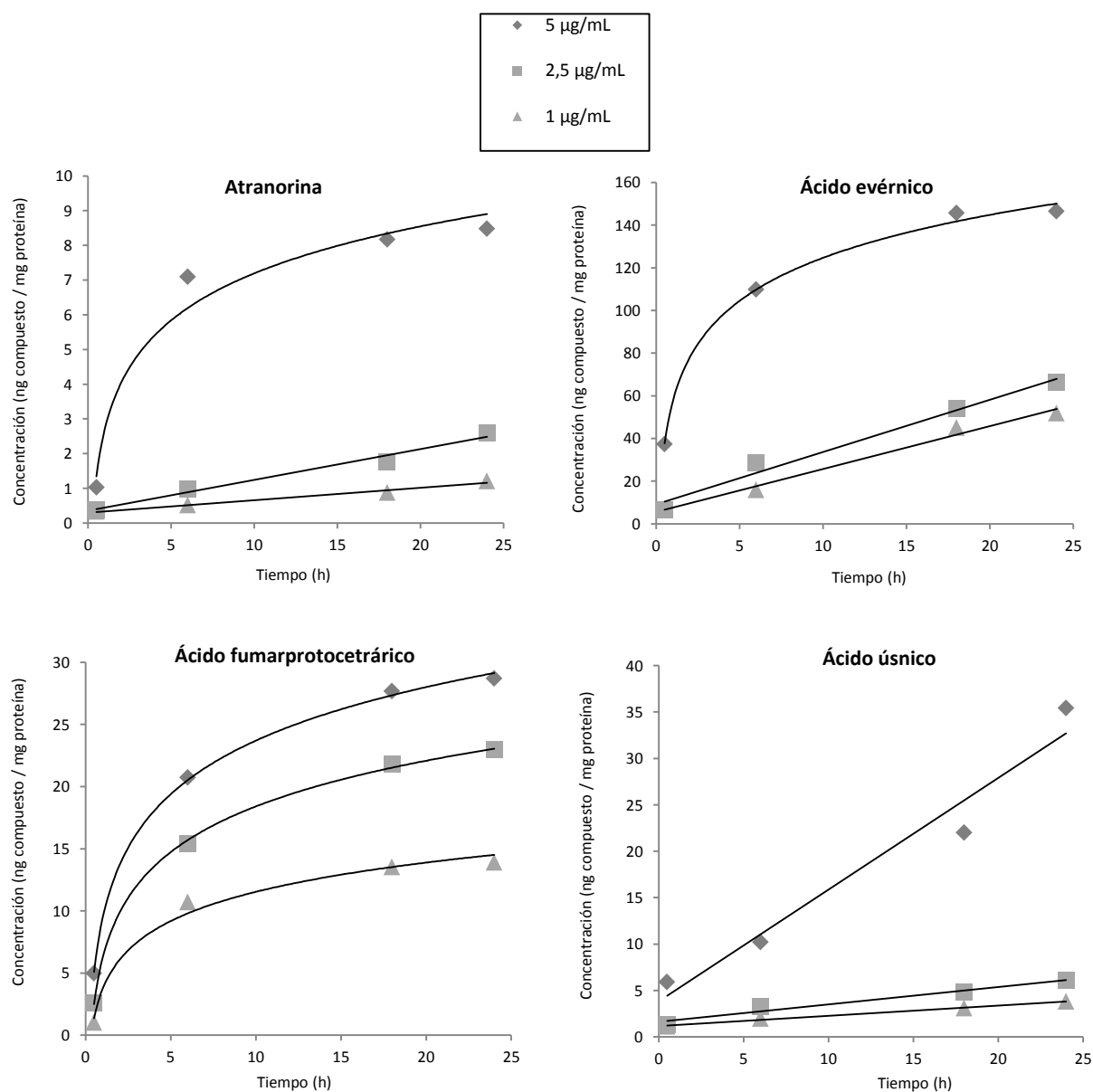


Figura 66. Captación de los compuestos liquénicos por las células RBE4. Se muestra la captación de los poliquétidos (concentraciones 1, 2,5 y 5  $\mu\text{g/ml}$ ) a lo largo del tiempo (0,5, 6, 18 y 24 h). Los niveles intracelulares de los compuestos se analizan por HPLC. Los resultados se expresan como ng compuesto/mg proteína.

Los cuatro compuestos presentan cinéticas de captación similares. En líneas generales, se observa que la captación de los compuestos a las concentraciones de 1 y 2,5  $\mu\text{g/ml}$  presenta una cinética lineal (excepto el ácido fumarprotocetrárico), es decir, la captación se produce de una manera prácticamente constante a lo largo del tiempo.

A la concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$ , la captación es saturable (a excepción del ácido úsnico), presentando una captación lineal durante las primeras horas del estudio (al menos hasta las 6 h) y con una meseta al final del mismo. Esto indica que los compuestos presentan en el tercer punto de medida (18 h) una cantidad intracelular igual o muy próxima a la cantidad máxima de captación al final del ensayo (24 h). Dichos resultados sugieren que, a mayores concentraciones de los compuestos liquénicos, las células RBE4 están próximas a alcanzar su capacidad de saturación y son incapaces de captar mayores cantidades, y que la captación más efectiva por las células endoteliales se produce durante las primeras 6 h de tratamiento. El ácido úsnico es una excepción a esta cinética; incluso a la concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$ , su captación permanece lineal durante todo el ensayo, lo que indica que tiempos de incubación mayores (e incluso mayores concentraciones) podrían resultar en cantidades intracelulares más elevadas.

### **3.2.3. Permeabilidad a través de BHE**

Tras evaluar la captación por células endoteliales, los estudios de permeabilidad tienen como finalidad estimar si la BHE (con una permeabilidad muy selectiva) restringe el paso de los compuestos liquénicos por difusión pasiva.

Para ello, se ha utilizado la línea hCMEC/D3 (derivada de endotelio microvascular cerebral humano) como un modelo celular que mimetiza muchas de las propiedades esenciales de la BHE del cerebro (tal y como se describe en el apartado 1.3.2. de Material y Métodos). De forma similar a los estudios de captación, el paso previo al estudio de permeabilidad consiste en determinar si los tratamientos con los compuestos liquénicos ejercen un efecto citotóxico sobre las células hCMEC/D3 (concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$  y tiempo de 24 h). Como se observa en la Figura 67, los resultados del ensayo de reducción de MTT demuestran que ninguno de los compuestos a la concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$ , y en tratamiento de 24 h, disminuye significativamente la viabilidad celular de estas células.

La formación de uniones estrechas y la integridad de la monocapa de células endoteliales se comprueba evaluando la resistencia eléctrica transendotelial (TEER). Sólo aquellas monocapas con valores adecuados de TEER (en torno a  $50 \Omega \times \text{cm}^2$  tras 12-14 días de

cultivo) aseguran una correcta integridad y son utilizadas para los estudios de permeabilidad. La integridad de esas monocapas se confirma mediante el grado de permeación del compuesto “lucifer yellow”, que es menor del 2% en el momento previo al experimento.

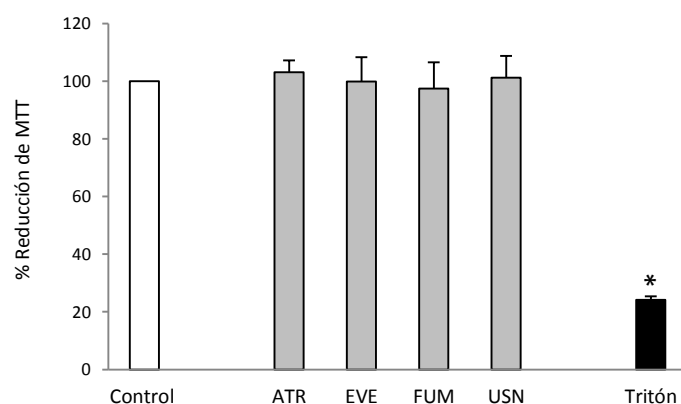


Figura 67. Resultados de viabilidad celular de la línea celular hCMEC/D3. Las células se tratan con los cuatro compuestos aislados a la concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$  durante 24 h. La reducción de MTT se expresa como % respecto al control (100% de viabilidad). Los resultados se expresan como media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$  versus control.

El tiempo de este ensayo se ha establecido en 24 h y la concentración de los compuestos, 5  $\mu\text{g/ml}$ , por ser el tiempo y la concentración con que se observa la máxima captación de los compuestos por células endoteliales en el apartado anterior. Según se describe en el apartado 2.5.3. de Material y Métodos, se determina la permeabilidad aparente ( $P_{\text{app}}$ ) de los compuestos aislados en dirección apical-basal (A-B), mimetizando el paso de la sangre al interior cerebral.

Los valores obtenidos de permeabilidad aparente para los cuatro compuestos liquénicos se recogen en la Tabla 21. Se observa que para todos los compuestos en estudio existe cierto grado de transporte en la dirección absorbiva apical-basal, pues para todos ellos se han podido cuantificar por HPLC los niveles de compuesto en el compartimento basal.

Compuesto	$P_{\text{app}}$ ( $\times 10^{-6} \text{ cm/s}$ )
Atranorina	$0,013 \pm 0,005$
Ácido evérnico	$3,045 \pm 0,147$
Ácido fumarprotocetrárico	$0,520 \pm 0,078$
Ácido úsnico	$1,272 \pm 0,182$

Tabla 21. Permeabilidad aparente de los compuestos liquénicos a través del modelo de celular de BHE (línea celular hCMEC/D3). El transporte de los compuestos (concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$ ) se ha evaluado durante 24 h horas en la dirección absorbiva (apical-basal). Media  $\pm$  DE.



Si se compara entre los distintos compuestos liquénicos, existen diferencias notables. Así, el ácido evérnico presenta el mayor valor de permeabilidad aparente ( $3,05 \times 10^{-6}$  cm/s), mientras que atranorina presenta el menor valor ( $0,01 \times 10^{-6}$  cm/s). Los valores de  $P_{app}$  de ácido úsnico y ácido fumarprotocetrárico son intermedios ( $1,27 \times 10^{-6}$  y  $0,52 \times 10^{-6}$  cm/s, respectivamente), detectándose una mayor permeación del primero que del segundo. Por tanto, la capacidad de atravesar la monocapa de células hCMEC/D3 sigue el mismo orden decreciente que la captación por células endoteliales RBE4.

El conjunto de resultados obtenidos en los estudios de captación y permeabilidad sugieren que el ácido evérnico presenta la mayor capacidad para atravesar la BHE por mecanismos de difusión pasiva por vía transcelular.

### 3.3. Potencial anticancerígeno

Tal y como se investigó para los extractos metanólicos de las seis especies de *Parmeliaceae* incluidas en este trabajo (apartado 1.3. de Resultados), se realiza una aproximación al estudio de la potencial actividad anticancerígena de los cuatro metabolitos liquénicos aislados. Para ello, se evalúa, mediante el ensayo de reducción de MTT, su actividad citotóxica sobre dos líneas celulares derivadas de tumores humanos: HepG2 (carcinoma hepatocelular) y MCF-7 (adenocarcinoma de mama). Se realizan tratamientos celulares de 24 h en un amplio rango de concentraciones para cada compuesto (0,25 - 250  $\mu$ g/ml).

Los resultados de viabilidad celular obtenidos se muestran en la Figura 68, expresados como porcentaje de reducción de MTT respecto a las células control (100% viabilidad). En general, los compuestos liquénicos tienen un efecto concentración-dependiente y afectan a la viabilidad celular de ambas líneas a las concentraciones más elevadas. Así, concentraciones iguales o superiores a 50  $\mu$ g/ml demuestran una efectiva disminución de la supervivencia celular (excepto la atranorina a 50  $\mu$ g/ml). Las células MCF-7 (Figura 68B) se muestran ligeramente más sensibles que las HepG2 a las concentraciones elevadas de los compuestos y, a la concentración de 25  $\mu$ g/ml, todos los compuestos liquénicos (a excepción de atranorina) ejercen citotoxicidad, reduciendo su actividad mitocondrial (como indicador de viabilidad celular), que se refleja en la menor reducción del MTT. Las concentraciones más bajas estudiadas (por debajo de 5  $\mu$ g/ml) no afectan a la viabilidad celular en ningún caso.

Cabe destacar el marcado efecto citotóxico que ejerce el ácido úsnico sobre ambos tipos de células cancerígenas y, en especial, sobre las HepG2 derivadas de carcinoma hepático, en

las que la concentración de 10 µg/ml ya reduce la viabilidad de estas células a la mitad. Este dibenzofurano también ejerce efectos citotóxicos significativos sobre las células MCF-7 a partir de 5 µg/ml. Los interesantes resultados obtenidos para el ácido úsnico se correlacionan con los efectos citotóxicos obtenidos para los extractos metanólicos de *Usnea ghattensis* y *Vulpicida canadensis*, en los que es un componente mayoritario.

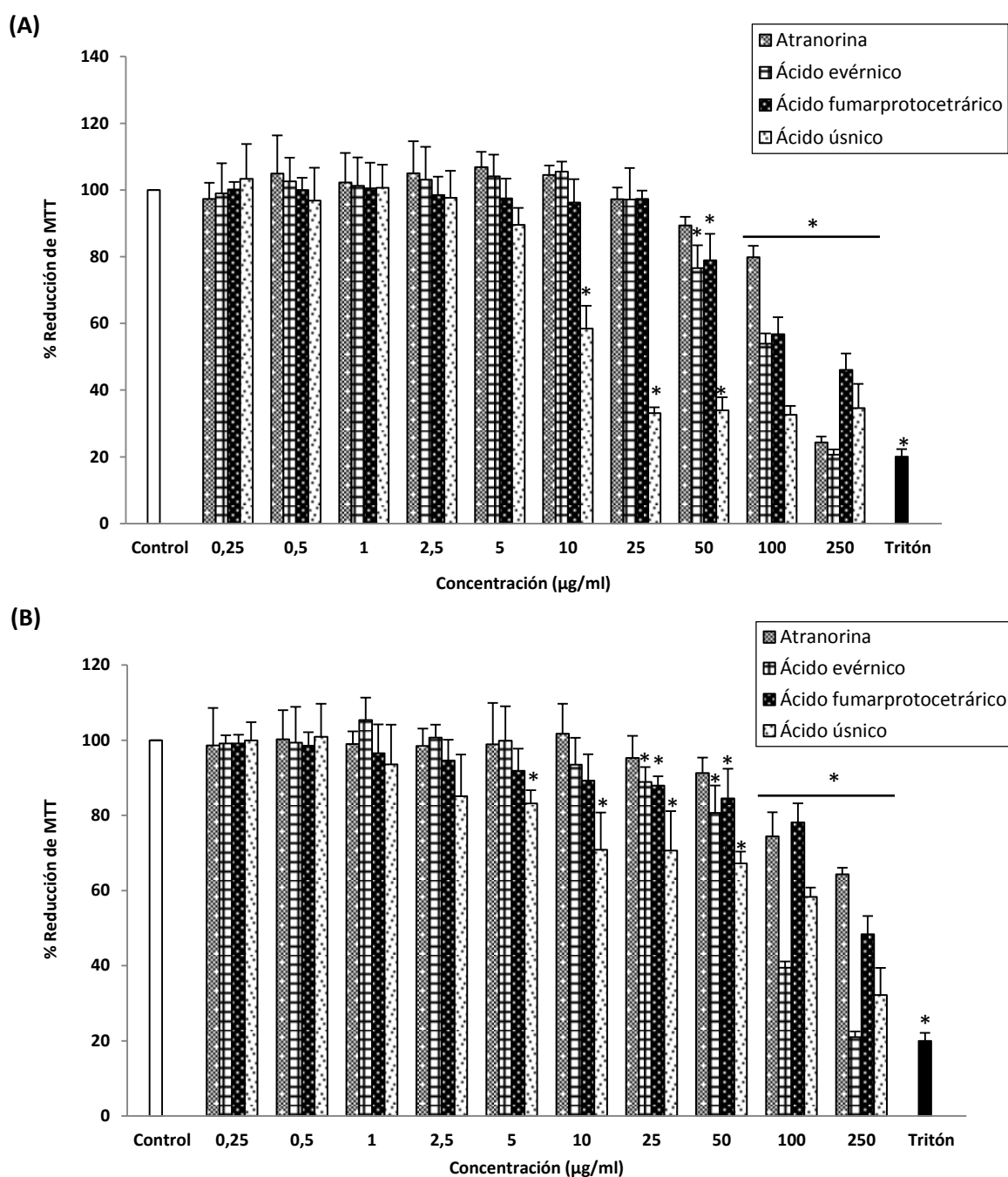


Figura 68. Resultados de viabilidad celular de las líneas celulares HepG2 (A) y MCF-7 (B). Las células se tratan con los cuatro compuestos líquénicos durante 24 h y en un amplio rango de concentraciones (0,25 - 250 µg/ml). La reducción de MTT se expresa como % respecto al control (100% de viabilidad). Los resultados se expresan como media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$  versus control.

También es muy notable la citotoxicidad mostrada por el ácido evérnico sobre las células MCF-7 derivadas de carcinoma de mama; a concentraciones elevadas, el ácido evérnico disminuye la viabilidad de estas células hasta los niveles similares a los de tritón (control negativo). Por otro lado, atranorina es el compuesto que demuestra un menor potencial citotóxico para afectar a la viabilidad celular de ambas líneas.

En la Tabla 22, se muestran los valores de concentración letal 50 ( $CL_{50}$ , concentración a la cual se reduce la viabilidad celular al 50%, respecto a células control) para cada uno de los compuestos estudiados frente a las líneas celulares HepG2 y MCF-7.

Tratamiento	Línea celular HepG2	Línea celular MCF-7
Atranorina	201,98 $\mu\text{g/ml}$	487,91 $\mu\text{g/ml}$
Ácido evérnico	115,02 $\mu\text{g/ml}$	80,16 $\mu\text{g/ml}$
Ácido fumarprotocetrárico	164,39 $\mu\text{g/ml}$	245,87 $\mu\text{g/ml}$
Ácido úsnico	14,29 $\mu\text{g/ml}$	141,34 $\mu\text{g/ml}$

Tabla 22. Concentración letal 50 ( $CL_{50}$ ) obtenida para cada compuesto y cada línea celular.

## 4. ESTUDIO FILOGENÓMICO DEL MICOBIONTE DE *CETRARIA ISLANDICA*

### 4.1. Secuenciación y ensamblaje del genoma

El paso inicial, previo a predecir los genes biosintéticos en el genoma de *Cetraria islandica*, consiste en el desarrollo del cultivo del micobionte, la extracción y secuenciación de su ADN genómico y el posterior ensamblaje del genoma.

#### 4.1.1. Cultivo del micobionte

El cultivo del micobionte de *Cetraria islandica* se lleva a cabo según las condiciones descritas en el apartado 2.6.1.1. de Material y Métodos. En la Figura 69 se presentan las fotografías obtenidas en las distintas fases del desarrollo del cultivo, desde las esporas (obtenidas del espécimen fértil) recién germinadas (Figura 69A) hasta las fases posteriores de desarrollo de las colonias fúngicas (Figuras 69B-D).

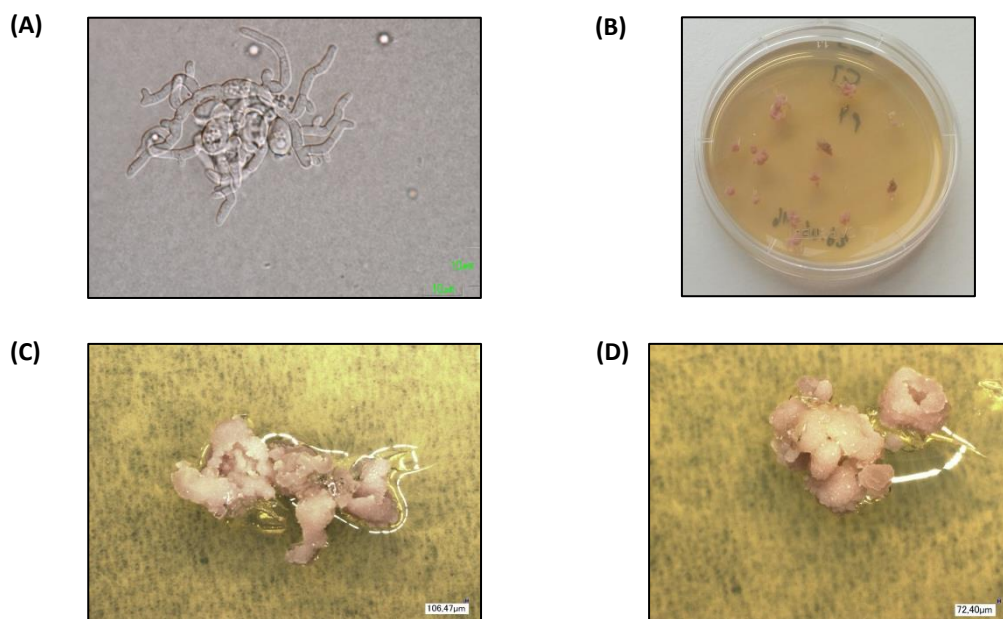


Figura 69. Imágenes representativas de distintas fases del desarrollo del cultivo. (A) Microfotografía ampliada de una espora fúngica germinada, aislada previamente a partir del espécimen fértil de *Cetraria islandica*. (B) Fotografía de una placa de cultivo con diversas colonias en desarrollo. (C) y (D) Microfotografías ampliadas de dos colonias del micobionte en distintos estados de desarrollo.

Tras 7 meses desde el inicio del cultivo, se consigue un desarrollo adecuado de las colonias, que presentan todas un color homogéneo y sin contaminación aparente. En ese

punto, se extrae una muestra de ADN para la amplificación, empleando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de la región ITS en el ADN ribosomal. El resultado de la secuencia obtenida coincide con la secuencia ITS de *Cetraria islandica* almacenada en la base de datos GenBank (> 99% de similitud). Este resultado nos permite confirmar la identidad del hongo en cultivo y descartar la presencia de otras especies de hongos en el mismo, por lo que podemos confirmar la obtención de un cultivo puro.

#### 4.1.2. Análisis fitoquímico

En primer lugar, se realiza un proceso de extracción en metanol y análisis fitoquímico del espécimen de *Cetraria islandica* a partir del cual se ha establecido el cultivo del micobionte, según los procedimientos descritos en el apartado 2.1. de Material y Métodos. El objetivo es analizar la síntesis de ácido fumarprotocetrárico, metabolito secundario mayoritario de *Cetraria islandica* cuyo interés farmacológico se ha demostrado en el presente trabajo. Tal y como se muestra en la Figura 70A, el talo liquénico sí contiene ácido fumarprotocetrárico, siendo éste el componente mayoritario del extracto metanólico obtenido (más del 90% del área integrada en el cromatograma). La identificación del compuesto se realiza por comparación de tiempos de retención y datos espectroscópicos con el compuesto patrón aislado, como se ha detallado anteriormente en este trabajo.

Por otro lado, toda vez que se obtiene biomasa suficiente del micobionte en cultivo, se busca analizar si el hongo aislado (sin fotobionte) sintetiza el ácido fumarprotocetrárico, cuya producción por el liquen sí ha sido demostrada en el talo. Con este fin, se lleva a cabo una extracción del micelio en metanol y el posterior análisis del extracto por HPLC en las condiciones anteriormente descritas (apartado 2.1. de Material y Métodos). Los resultados obtenidos también confirman la síntesis de ácido fumarprotocetrárico por el micobionte en cultivo (Figura 70B), pero su síntesis en el cultivo resulta menos significativa cuantitativamente respecto a la síntesis en el talo liquénico. La presencia de otras señales correspondientes a otros compuestos en el extracto metanólico del micobionte puede deberse a la presencia de compuestos procedentes del medio de cultivo, que se estaban adheridos al micelio en el momento de la extracción.

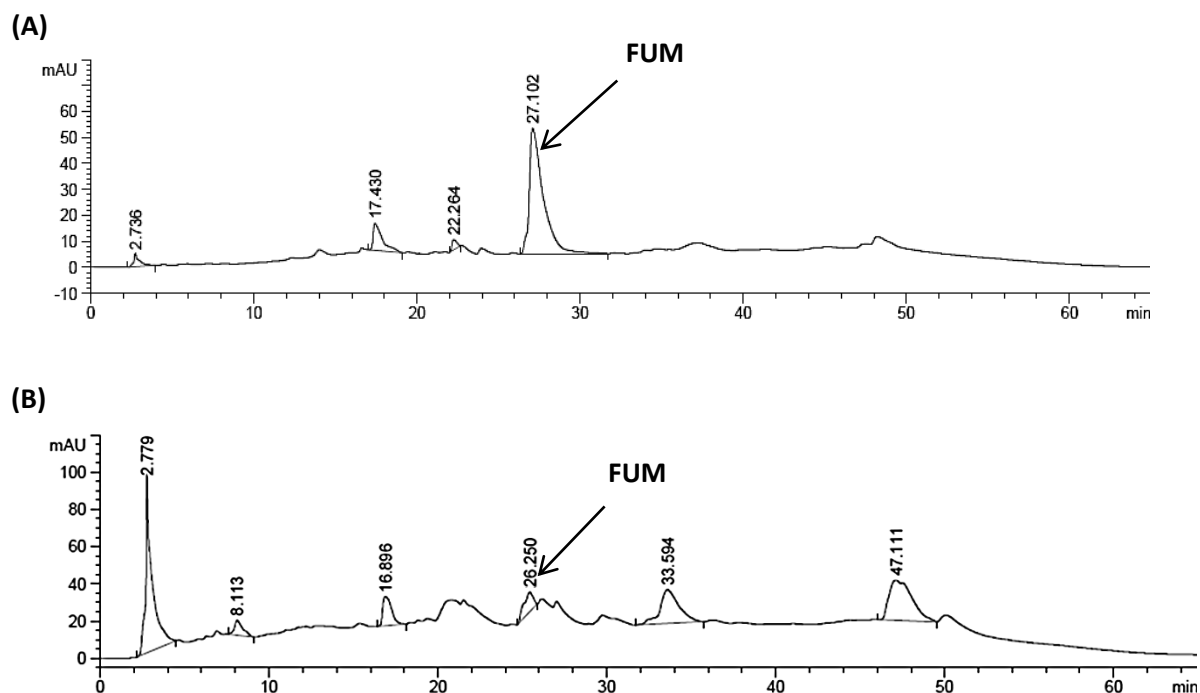


Figura 70. Cromatogramas adquiridos a 254 nm. (A) Extracto metanólico obtenido a partir del talo líquénico del espécimen de *Cetraria islandica* usado para establecer el cultivo. (B) Extracto metanólico a partir del micobionte de *Cetraria islandica* en cultivo. El ácido fumarprotocetrárico se identifica en ambos casos.

#### 4.1.3. Secuenciación del genoma

Tras el análisis fitoquímico, se procede a realizar la extracción de ADN genómico del micobionte en cultivo (según el protocolo descrito en el apartado 2.6.1.3. de Material y Métodos). Se obtuvieron 23,8 µg de ADN genómico de alta pureza. Además, la electroforesis en gel de agarosa evidencia el elevado peso molecular y la escasa fragmentación del ADN extraído (Figura 71), cualidades necesarias para obtener una correcta secuenciación.

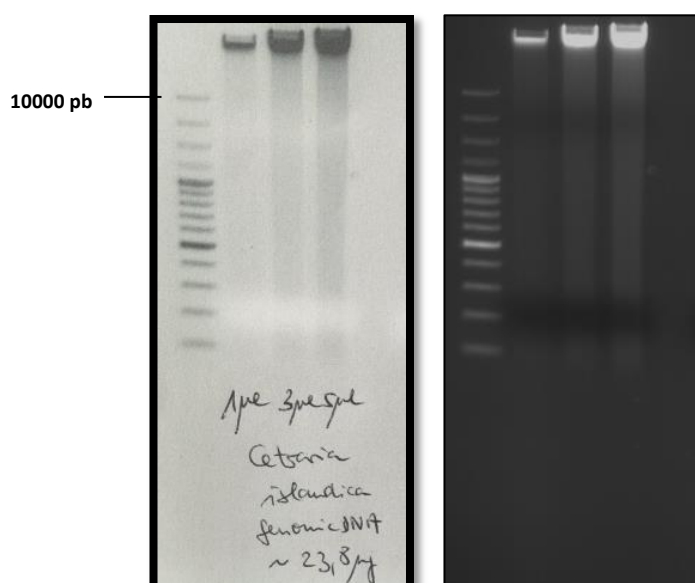


Figura 71. Imágenes obtenidas por transiluminación tras la electroforesis de la muestra de ADN en un gel de agarosa 1%. Se observa un elevado peso molecular (> 10000 pares de bases) y escasa degradación del ADN. De izquierda a derecha, se cargan concentraciones crecientes de la muestra de ADN.

La secuenciación de la muestra de ADN genómico proporciona tres librerías de fragmentos de ADN (*reads*) con las que se trabajará en los pasos siguientes:

- Una librería *paired-end* de fragmentos pareados de ~600 pares de bases de longitud.
- Dos librerías *mate-pairs* de fragmentos de pequeña longitud (~150 pb).

Las librerías *mate-pairs* ayudan a mejorar el ensamblaje del genoma que se obtiene con la librería *paired-end*, proporcionando una mejor calidad del mismo respecto al uso exclusivo de una librería *paired-end*.

#### 4.1.4. Ensamblaje de los *contigs* y *scaffolding*

Una vez obtenidas las secuencias de los fragmentos de ADN, a partir de ellas se procede a ensamblar el genoma completo de *Cetraria islandica* mediante la metodología detallada en el apartado 2.6.1.4. de Material y Métodos.

Tras el ensamblaje *de novo* de las secuencias de ADN utilizando los programas SPAdes, SSPACE y GapFiller, se analiza la asignación taxonómica de los *scaffolds* obtenidos (mediante el uso de los softwares DIAMOND y Megan). Se pudo descartar una contaminación significativa del cultivo del micobionte por bacterias, virus u otros hongos, y se confirmó la asignación de casi todos los *scaffolds* como pertenecientes a la clase *Lecanoromycetes*, y dentro de ella, a *Parmeliaceae* en su gran mayoría (Figura 72). En este punto, se extrajeron los *scaffolds* correspondientes a *Parmeliaceae*, para trabajar con un criterio de mayor calidad.



Figura 72. Asignación taxonómica de los *scaffolds* resultantes del ensamblaje del genoma de *Cetraria islandica*. La casi totalidad de ellos se asignan en *Parmeliaceae* dentro de la clase *Lecanoromycetes*.

El genoma obtenido finalmente para el micobionte de *Cetraria islandica* presenta como características más relevantes las recogidas en la siguiente Tabla 23. La longitud de los *scaffolds* obtenidos se expresa en pares de bases (pb) de ADN.

Genoma de <i>Cetraria islandica</i>	
Número de <i>scaffolds</i>	3472
Tamaño total del genoma	62.515.572 pb
<i>Scaffold</i> de mayor tamaño	841.775 pb
<i>Scaffold</i> de menor tamaño	500 pb
N50	95.207 pb

Tabla 23. Principales características del ensamblaje del genoma de *Cetraria islandica*.

Se obtiene un genoma que comprende 3472 *scaffolds*, con una longitud total de 62,5 Mb (millones de bases) y un 85% de ensamblaje de los *contigs* previos hasta *scaffolds*. Todos los *scaffolds* son superiores a 500 pb y el *scaffold* más largo comprende 841 Kb (miles de bases). La longitud media de los *scaffolds* es de 18 Kb, y el valor de N50 de 95 Kb, que indica que la mitad (50%) del ensamblaje del genoma se contiene en *scaffolds* iguales o superiores a dicha longitud (95 Kb).

Un análisis final de la calidad del ensamblaje del genoma con el programa BUSCO confirma un alto grado de completitud (94%) del genoma de *Cetraria islandica*. Sin embargo, predice un 33% de duplicidades, hecho que debe ser tenido en cuenta en fases posteriores de predicción de genes biosintéticos para evitar una sobre-estimación de los genes PKSs.

## 4.2. Predicción de genes biosintéticos

La anotación y predicción inicial de genes sobre los *scaffolds* del genoma, mediante el uso de los programas MAKER2 y Blast2Go, permite la detección de 20.758 genes.

Posteriormente, los *scaffolds* ensamblados se analizan por AntiSMASH 3.0 con el objetivo de la predicción de *clusters* de genes biosintéticos. De forma general, dicho análisis identifica un total de 112 *clusters* biosintéticos en el genoma de *Cetraria islandica*. En el presente trabajo nos centraremos fundamentalmente en el análisis de los genes PKSs, por ser los principales implicados en la síntesis de poliquétidos; por tanto, se propone que un gen PKS será responsable de las síntesis del ácido fumarprotocetrárico por dicho líquen. El análisis de



AntiSMASH predice un total de 51 genes PKSs, de los cuales 47 son PKS tipo I, 3 de ellos son genes mixtos PKS tipo I-NRPS y 1 es mixto PKS tipo I-PKS tipo 3.

Tipo de <i>cluster</i> biosintético	Número de genes identificados
PKSs	51
NRPSs	16
Sintasas de terpenos	20
Indol sintasas	2
Otros genes biosintéticos	23

Tabla 24. Predicción de genes biosintéticos en el genoma de *Cetraria islandica*.

El informe de AntiSMASH incluye las estadísticas del análisis con BLAST para los distintos genes PKSs identificados. BLAST es una herramienta informática del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) que encuentra las regiones de similitud entre secuencias de nucleótidos o proteínas problema con aquellas secuencias incluidas en las bases de datos y calcula la significación estadística. Así, AntiSMASH proporciona el grado de identidad y similitud con el gen homólogo previamente descrito y más cercano a los *clusters* anotados.

Tras analizar detalladamente todos los genes identificados como PKSs (51), se descartan algunos *clusters* por estar incompletos o discontinuos. Se considerarán únicamente aquellos genes PKS que son continuos (los distintos dominios se anotan en una región continua del *scaffold*) y que son completos, es decir, cumplen el criterio de presentar los dominios mínimos para la funcionalidad de una enzima PKS: los dominios KS (quetosintasa), AT (aciltransferasa) y ACP (acil-carrier transportador). De los 51 genes identificados inicialmente como PKS, sólo 29 son completos. Además, de entre ellos, 20 corresponden a PKS de tipo reductora y 9 a PKS de tipo no reductora. Dicha división se realiza en base a la presencia o ausencia de los dominios enoilreductasa (ER), ketoreductasa (ER) y dehidratasa (DH), que determinan la capacidad reductora de la enzima.

De los 29 genes seleccionados, sólo uno de ellos presenta similitud significativa con otra secuencia PKS previamente descrita en líquenes. En concreto, se trata de un *cluster* biosintético que presenta una longitud de aprox. 34 Kb y se identifica en una zona central y continua dentro del *scaffold* número 270. Dentro de él, se predice un gen PKS tipo I; se conoce que las PKS tipo I son las encargadas de la síntesis de poliquétidos en líquenes (Stocker-Wörgötter, 2008). Además, esta PKS es de tipo no-reductora, ya que el gen está constituido

únicamente por los dominios KS, AT, ACP y TE (tioesterasa). Ésto también está en consonancia con los requisitos necesarios de una PKS para la síntesis de depsidonas que presentan grupos carbonilos no reducidos (como es el caso del ácido fumarprotocetrárico).

En la siguiente Figura 73 se ilustra la posible estructura predicha por AntiSMASH para este gen PKS candidato y sus distintos dominios. Dicho *cluster* biosintético incluye, además, un gen identificado como citocromo P-450 y presenta un 66% de similitud con la PKS identificada previamente en *Cladonia grayi* como responsable de la síntesis del ácido grayánico (Armaleo y col., 2011), que presenta una estructura tipo depsidona similar a la del ácido fumarprotocetrárico. El *cluster* de *C. grayi* presenta, además, un gen que codifica para una enzima O-metiltransferasa (O-MT) que está ausente en el caso del *cluster* de *Cetraria islandica*. Se determinará posteriormente la situación filogenética del gen PKS candidato mediante el análisis de su secuencia aminoacídica KS junto a otras secuencias KS fúngicas.

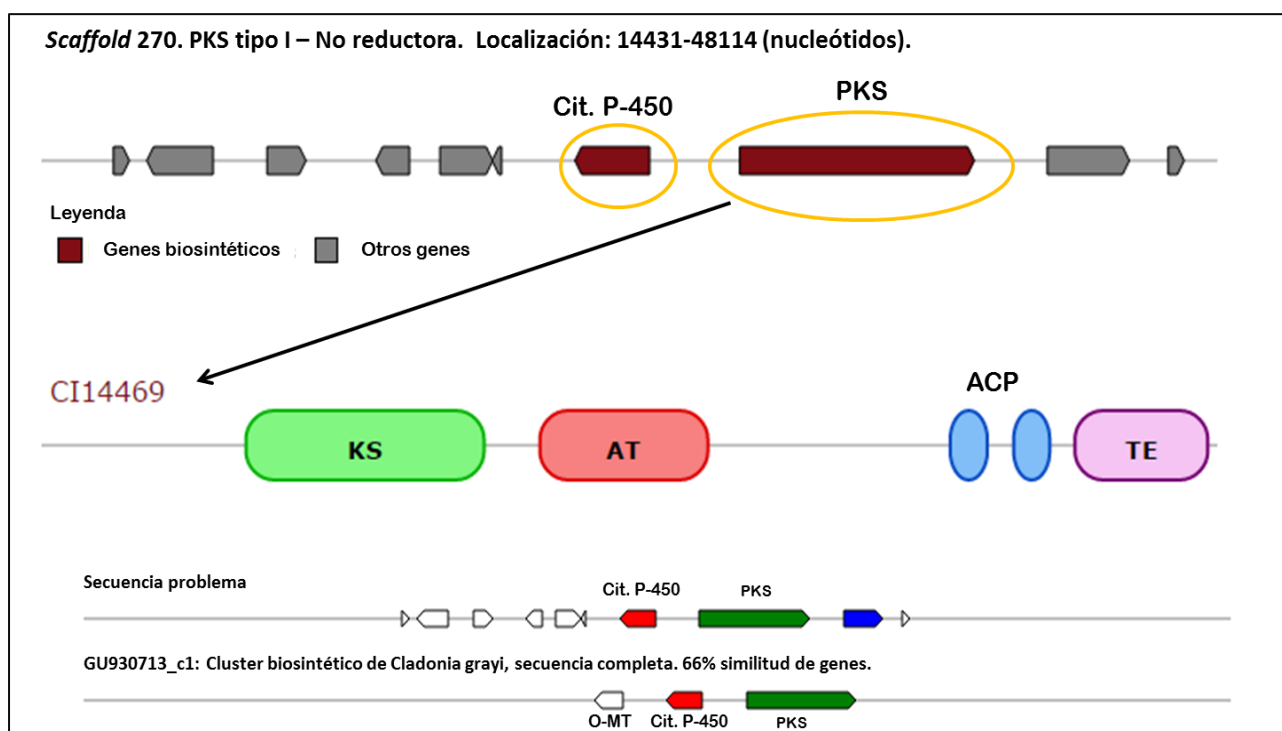


Figura 73. *Cluster* biosintético identificado como posible candidato de la síntesis de ácido fumarprotocetrárico. Se identifica en el *scaffold* número 270, desde la base en posición 14431 hasta la base 48114. Presenta un grado de similitud del 66% respecto a la PKS previamente identificada en el genoma de *Cladonia grayi* para la síntesis del metabolito líquénico ácido grayánico (depsidona).

### 4.3. Análisis de la filogenia de las secuencias KS

A fin de apoyar la hipótesis sobre el gen PKS candidato para la síntesis del ácido fumarprotocetrárico, se pretende situar este gen en el contexto evolutivo de otros genes PKS fúngicos, y la relación con éstos. Para ello, se desarrolla un análisis filogenético utilizando las secuencias aminoacídicas de los dominios quetosintasa (KS), que son los dominios más importantes en la funcionalidad de las PKS y se trata de regiones proteicas muy conservadas (Abdel-Hamed y col., 2016). Se han incluido todas las secuencia KS extraídas de los *clusters* identificados como PKS tipo I en el genoma de *Cetraria islandica* y otras secuencias KS fúngicas depositadas en GenBank.

Siguiendo el procedimiento indicado en la sección 2.6.3. de Material y Métodos, se construye un árbol filogenético en el que se incluyen un total de 253 secuencias KS, así como un *outgroup* de referencia con 7 secuencias de genes de ácido graso sintasas de animales (Figura 74). Se utilizó la genealogía de los dominios KS para inferir homología de las PKS tipo I en *Cetraria islandica*. Se observa que las PKSs fúngicas utilizadas en el análisis se agruparon en tres clados principales: no-reductoras, sintasas del ácido 6-metilsalicílico y reductoras. Entre el clado que incluye a las PKS no reductoras y el que incluye a las sintasas del ácido 6-metilsalicílico se establece una relación de grupos hermanos bien respaldada, tal y como se ha sugerido en estudios previos (Kroken y col., 2003). A la vista de los resultados de la inferencia filogenética (por el método de máxima verosimilitud) de todas las secuencias KS utilizadas, se pudo descartar la presencia de genes PKS duplicados en nuestro genoma, ya que no hubo dos secuencias KS que agruparan en el mismo clado con alta consistencia (lo que habría indicado una elevada homología entre ambas).

Por otro lado, los resultados de homología de secuencias KS muestran que sólo una secuencia KS del genoma de *Cetraria islandica* se agrupa con alto nivel de consistencia (alto grado de homología) con la secuencia KS responsable de la síntesis de ácido grayánico en *Cladonia grayi*, y también con otra secuencia KS de otra especie liquénica del género *Cladonia* (*C. rangiferina*). La secuencia KS en cuestión corresponde al *scaffold* 270, y se incluye en el gen PKS sido descrito en el apartado anterior. Por tanto, el estudio filogenético también apunta al gen PKS anotado por AntiSMASH en el *scaffold* 270 como el más probable candidato para la síntesis de ácido fumarprotocetrárico en *Cetraria islandica*.



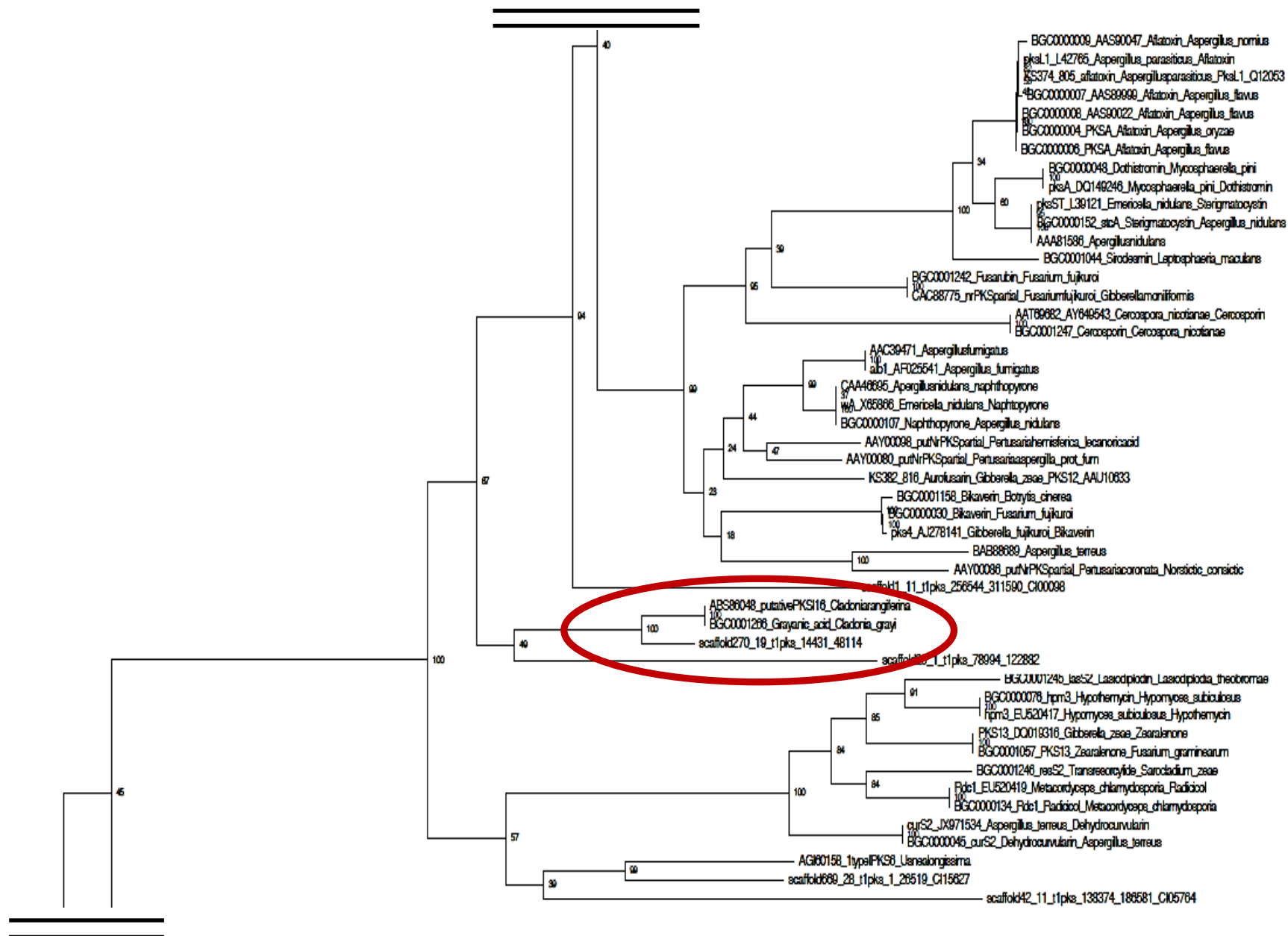


Figura 74. Árbol filogenético obtenido por inferencia basada en el principio de máxima verosimilitud de las secuencias KS. *Continúa en la página siguiente.*

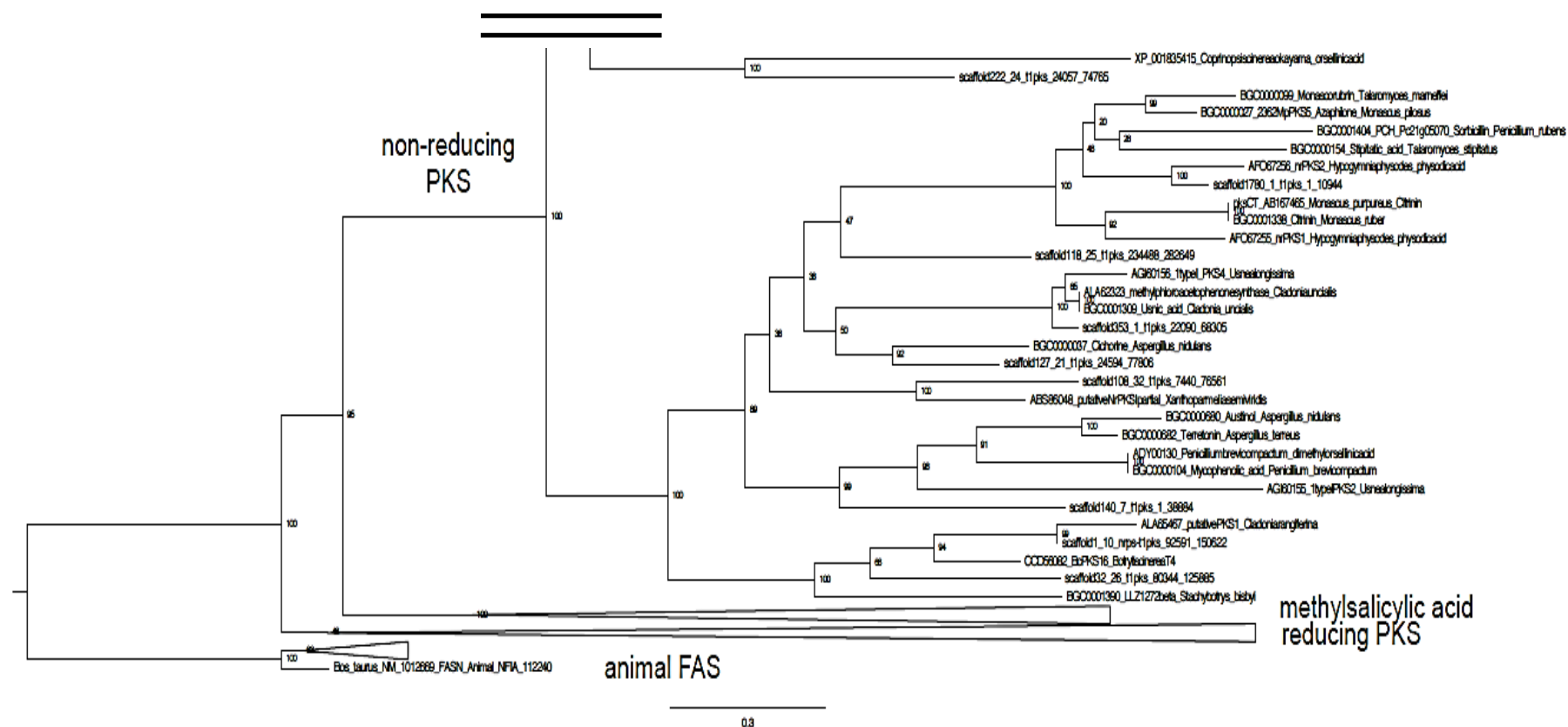


Figura 74. Árbol filogenético obtenido por inferencia basada en el principio de máxima verosimilitud de las secuencias KS. El clado correspondiente a las PKS no reductoras se muestra expandido. En rojo, se remarca el clado de interés (ampliado en la Figura 77).

# DISCUSIÓN

- - - - -

En condiciones fisiológicas, las células del organismo se encuentran en una situación de homeostasis celular redox que se traduce en un adecuado balance entre los niveles de pro-oxidantes y sistemas de defensa antioxidantes. Cuando se rompe dicho equilibrio a favor de las especies pro-oxidantes, por una mayor producción de especies reactivas (principalmente ERO) y/o por un déficit en los antioxidantes endógenos, se genera una situación anómala conocida como estrés oxidativo (EO). El mantenimiento en el tiempo del EO celular implica el daño oxidativo a todas las biomoléculas, desde las proteínas citosólicas o lípidos de membrana hasta los ácidos nucleicos (Halliwell, 2006).

Durante las últimas décadas, han sido muy numerosos los estudios que demuestran la implicación del EO en numerosas enfermedades de distinta naturaleza. En esa línea, diversos trabajos experimentales *in vitro* e *in vivo*, así como *estudios post-mortem* en cerebros de pacientes, apoyan la importancia del EO en la fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica, entre otras (Andersen, 2004; Thanan y col., 2014; Niedzielska y col., 2016). Tal y como se recoge detalladamente en la Revisión Bibliográfica de este trabajo, las características anatómico-funcionales del sistema nervioso central (SNC), y en concreto del cerebro, hacen que este órgano sea una diana especialmente susceptible al daño por EO. En las neuronas (unidad funcional principal del SNC), el EO puede provocar daño celular irreversible a través de mecanismos como la peroxidación de lípidos de membrana, la modificación oxidativa de las bases nitrogenadas de ADN y ARN y la inactivación de determinadas enzimas, entre otros. Cuando el daño es irreparable por los mecanismos de protección celulares, la acumulación de alteraciones desemboca en muerte celular, principalmente por mecanismos de apoptosis (Valko y col., 2007; Hung y col., 2010).

Las limitaciones en el conocimiento de la etiología y la falta de eficaces terapias preventivas frente a los trastornos neurodegenerativos, que en la mayoría de casos se asocian a la edad, contribuyen a que en el momento del diagnóstico exista una elevada e irreparable degradación del SNC. Por ello, la mayoría de tratamientos disponibles presentan una eficacia reducida y sólo consiguen mejorar parcialmente los síntomas cognitivos y motores de las distintas enfermedades (Flórez y col., 2013; Hickman y col., 2016). Además, con el incremento de la esperanza de vida y el envejecimiento paulatino de la población mundial, los procesos neurodegenerativos crónicos aumentan su prevalencia y constituyen un problema de salud pública y coste sanitario cada día más importantes. La asociación entre la investigación básica



y clínica debe permitir conocer mejor su etiopatogenia y desarrollar nuevas estrategias terapéuticas eficaces destinadas a prevenir, atenuar y retrasar la progresión de estas enfermedades (Brettschneider y col., 2015; González-Polo y col., 2015).

Actualmente, las estrategias farmacológicas con un mayor respaldo científico para combatir las situaciones de EO celular y prevenir/atenuar el daño a biomoléculas se centran en el aporte de compuestos con propiedades antioxidantes capaces de disminuir los niveles excesivos de ERO, reducir los niveles de iones metálicos libres y potenciar los sistemas antioxidantes endógenos (enzimático y no enzimático) (Fujita y col., 2012; Pisoschi y col., 2015).

En este contexto, los productos naturales cobran especial relevancia como fuente muy variada de compuestos activos con un amplio rango de propiedades farmacológicas, entre las que se incluyen las actividades antioxidantes. En los últimos años, se ha prestado especial interés a las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos y, en base a ellas, a su potencial como agentes neuroprotectores, llegándose a realizar ensayos clínicos con algunos de ellos en enfermedades como el Parkinson o el Alzheimer (Joyner y Cichewicz, 2011; Ajami y col., 2016).

Las investigaciones más recientes se han encaminado a profundizar notablemente en el conocimiento de las propiedades antioxidantes y neuroprotectoras, en modelos *in vitro* e *in vivo*, de diversos metabolitos secundarios aislados de plantas superiores y hongos de vida libre, destacando compuestos fenólicos como la epigallocatequina galato, la curcumina o el resveratrol, entre otros (Zhong y Xiao, 2009; Guerra-Araiza y col., 2013; Phan y col., 2015). En las últimas décadas, también ha surgido un novedoso interés por las propiedades antioxidantes derivadas de los metabolitos secundarios de líquenes, de los cuales se tiene menos información farmacológica. Tal y como se recoge en la Revisión Bibliográfica, se han publicado resultados prometedores de actividades antioxidantes para extractos y metabolitos líquénicos, principalmente en ensayos *in vitro* de captación de radicales libres (p. ej., por el método de DPPH) o de inhibición de la oxidación de lípidos. Cabe destacar que la mayoría de los metabolitos secundarios farmacológicamente activos identificados en líquenes pertenecen al grupo de los poliquétidos, presentando en su estructura grupos fenólicos (Gülçin y col., 2002; Mitrovic y col., 2011; Kosanic y col., 2013; White y col., 2014; Fernández-Moriano y col., 2016).

A la vista de todo lo anterior, y en línea con los trabajos mencionados, se marca como objetivo el estudio de los líquenes como fuentes de compuestos activos con propiedades antioxidantes y, en base a ellas, con capacidad de neuroprotección. Teniendo en cuenta la trayectoria científica de nuestros grupos de investigación, se ha realizado el estudio del potencial neuroprotector de seis especies de líquenes (*Cetraria islandica*, *Cetrelia braunsiana*, *Evernia prunastri*, *Parmotrema saccatilobum*, *Usnea ghattensis* y *Vulpicida canadensis*) de la familia *Parmeliaceae*, la más numerosa y de mayor interés farmacológico, así como del mecanismo de acción de cuatro compuestos aislados que se han identificado en ellas: atranorina, ácido evérnico, ácido fumarprotocetrárico y ácido úsnico. Las especies han sido seleccionadas en base a los resultados obtenidos en un *screening* inicial de actividad antioxidante (ensayo ORAC) de especímenes de 29 especies de líquenes parmeliáceos (Fernández-Moriano y col., 2015b), y teniendo en cuenta los datos aportados por la bibliografía científica revisada sobre actividades farmacológicas y usos etnomedicinales de líquenes (Illana-Esteban, 2012; Zambare y Cristopher, 2012; Gómez-Serranillos y col., 2014; White y col., 2014; Crawford, 2015).

El presente trabajo de Tesis Doctoral se plantea, por tanto, como la investigación del potencial protector de los compuestos liquénicos frente al daño oxidativo celular a nivel cerebral, y su posible aplicación en la terapia de procesos neurodegenerativos que se relacionan con el declive neuronal por daño oxidativo. Así, se evalúan las propiedades antioxidantes y citoprotectoras de los extractos metanólicos de las seis especies seleccionadas frente al estrés inducido por peróxido de hidrógeno en modelos celulares derivados de células de SNC. Una vez seleccionados los extractos activos, se procede a identificar y aislar los metabolitos secundarios principales responsables de la actividad, a fin de investigar de forma más detallada el potencial neuroprotector y el posible mecanismo de acción de los compuestos aislados. Para ello, se evalúan los efectos sobre la viabilidad y morfología celular, así como sobre parámetros relacionados con el estrés oxidativo intracelular (niveles de ERO, peroxidación lipídica, sistema antioxidante glutatión, contenido de enzimas antioxidantes e implicación de la vía de señalización Nrf2), sobre la funcionalidad mitocondrial y la apoptosis (potencial de membrana mitocondrial, niveles de calcio citosólico y mitocondrial, actividad de la enzima caspasa-3 y expresión de factores pro- y anti-apoptóticos), y sobre el proceso citoprotector de la autofagia. Por último, se procede a estimar la capacidad de los metabolitos liquénicos con actividades neuroprotectoras para difundir al SNC atravesando la barrera hematoencefálica.

Para el desarrollo de los estudios de neuroprotección, se utilizan dos **modelos celulares** derivados de células del SNC: de neurona y de astrocito. La selección de ambos modelos se realiza en base a la importancia de las neuronas como unidad básica de la funcionalidad del sistema nervioso, y a la relevancia cada día mayor que se reconoce a los astrocitos en la fisiopatología del SNC. Las neuronas son las células del SNC más sensibles y sufren la mayor afectación por daño oxidativo en enfermedades neurodegenerativas, caracterizadas por una muerte neuronal progresiva (Bains and Shaw, 1997; Brettschneider y col., 2015). Sin embargo, los enfoques de los mecanismos neuropatológicos centrados exclusivamente en las neuronas han resultado ser incompletos y no han dado lugar a grandes avances en la prevención y la terapia de enfermedades neurodegenerativas. Requieren, por tanto, de la consideración de la importancia funcional de las células de la glía, que también se ven afectadas por el daño oxidativo. Entre las funciones de los astrocitos destaca, además, el papel citoprotector que ejercen sobre las neuronas tanto en situaciones fisiológicas como en procesos de neurodegeneración (Rappold y Tieu, 2010; Ouyang y col., 2014; Verkhatsky y col., 2014; Guillamón-Vivancos y col., 2015).

Por todo ello, ambos tipos celulares constituyen potenciales dianas farmacológicas en la terapéutica de enfermedades neurodegenerativas. En el presente trabajo, se han seleccionado la línea celular SH-SY5Y (derivada de neuroblastoma humano) y la línea celular U373-MG (procedente de glioblastoma humano) como modelos de células neuronales (de tipo dopaminérgico) y de astrogliá, respectivamente. Ambas son ampliamente utilizadas por la comunidad científica para el estudio de mecanismos fisiológicos y de protección frente a diversos agentes estresantes externos; se han utilizado, por ejemplo, en la evaluación del potencial neuroprotector de compuestos de origen natural frente a daño oxidativo, así como para la identificación de dianas terapéuticas (Fang y col., 2003; Xie y col., 2010; Martín y col., 2011; González-Burgos y col., 2013b; Tommonaro y col., 2016).

En dichos modelos celulares, hemos establecido en una primera etapa las condiciones de daño oxidativo, para posteriormente evaluar si los compuestos liquénicos aportan protección frente al mismo. Con este fin, la **inducción de EO celular** se consigue mediante exposición de las células a **peróxido de hidrógeno exógeno**, puesto que el  $H_2O_2$  es una ERO que, en concentraciones fisiológicas, actúa como señalizador en diversos procesos como la inflamación o la diferenciación celular, pero que cuando se encuentra a elevadas concentraciones induce daño oxidativo a biomoléculas, por su capacidad de generar radicales hidroxilo (muy reactivos y tóxicos) en presencia de iones metálicos (Halliwell, 1992; Marinho y

col., 2014). De hecho, se ha descrito la implicación de niveles anormales  $H_2O_2$  en la muerte neuronal temprana que acontece en las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson (Tabner y col., 2005).

La exposición a  $H_2O_2$  exógeno ha demostrado, por la facilidad de esta ERO para atravesar membranas y acceder al interior celular, la capacidad de ejercer citotoxicidad por alteración de parámetros del estado redox intracelular en diversos modelos *in vitro*, entre los que se incluyen células derivadas de SNC; al mimetizar las alteraciones que acontecen *in vivo* en el SNC durante el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, constituye una estrategia ampliamente utilizada en la investigación de nuevos compuestos con potencial neuroprotector (González-Burgos y col., 2013b; Kwon y col., 2015; Porres-Martínez y col., 2015; Jiang y col., 2016). Partiendo de la experiencia previa de nuestro grupo de investigación y de ensayos iniciales, en este trabajo se establece el siguiente modelo de inducción de EO: exposición de las células SH-SY5Y y U373-MG durante 30 min a  $H_2O_2$  a las concentraciones de 0,1 mM y 1 mM, respectivamente. Se consigue, así, citotoxicidad por daño oxidativo con la consiguiente reducción de la viabilidad celular (un 40-45%) en ambos modelos. La diferente concentración de  $H_2O_2$  utilizada en cada caso permite apreciar la diferente sensibilidad de los dos modelos celulares al EO, presentando las neuronas una menor capacidad antioxidante que los astrocitos, que están más protegidos frente al daño oxidativo inducido por  $H_2O_2$  (Baxter y Hardingham, 2016).

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman que el  $H_2O_2$  ejerce su acción citotóxica mediante la modificación de estado redox celular, con alteración de diversos marcadores de EO en las dos líneas celulares. De hecho, la exposición a  $H_2O_2$  aumenta significativamente la generación de ERO intracelulares y los niveles de peroxidación lipídica (indicado por un aumento de MDA), y altera el equilibrio del sistema antioxidante glutatión a favor de la forma oxidada e inactiva del mismo. Todos estos cambios disminuyen la actividad enzimática mitocondrial de la célula (ensayo de reducción de MTT) como indicador de la viabilidad celular, y se reflejan en una alteración de la morfología celular normal. A este respecto, tanto las células SH-SY5Y como las células U373-MG expuestas a  $H_2O_2$  ven reducidos su número y tamaño originales, se presentan más débilmente adheridas a la placa de cultivo, y disminuye la presencia de prolongaciones celulares y la capacidad de formar agrupaciones.

Una vez establecidos los modelos de EO *in vitro*, y previamente a evaluar los efectos de los extractos líquénicos sobre ellos, se aborda el estudio de las propiedades antioxidantes de los extractos metanólicos mediante la determinación del **contenido en polifenoles** y pruebas

de **captación de radicales libres** (ensayo ORAC y ensayo DPPH). Los rendimientos de la extracción con metanol a partir de los talos liquénicos resultan similares a datos publicados previamente para especies de *Parmeliaceae* (Stojanovic y col., 2010), situándose en el rango entre 3,44 y 14,14% (p/p). Son, además, datos acordes a los contenidos totales de metabolitos secundarios en líquenes, estimados entre el 5% y el 12% para una gran mayoría de especies (Solhaug y col., 2009; Zambare y col., 2012). La elección del metanol para la preparación de los extractos se debe a que este solvente favorece una eficiente extracción de metabolitos secundarios de diversos productos naturales, en especial de compuestos fenólicos (Qasim y col., 2016). Así, se encuentra una positiva correlación entre el rendimiento de la extracción y el contenido en polifenoles en los extractos (Rankovic y col., 2011), siendo el extracto de *Evernia prunastri* el que presenta el mayor rendimiento de la extracción y el mayor contenido en compuestos fenólicos.

Uno de los principales mecanismos de acción de las moléculas antioxidantes consiste en la interacción directa y captación de ERO, para prevenir los procesos de oxidación en cadena en los sustratos biológicos (Filipský y col., 2015). El ensayo químico ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno) permite evaluar la captación directa de radicales peroxilo (generados a partir del azocompuesto AAPH), similares a los que se producen *in vivo* en los procesos de peroxidación lipídica (Cao y Prior, 1999). En general, los extractos liquénicos muestran una mayor capacidad de captación de dichos radicales en comparación con trolox como antioxidante de referencia, siendo el extracto de *Evernia prunastri* el que presenta una mayor actividad antioxidante. Esta actividad de captación de radicales peroxilo es notablemente mayor a la demostrada en el mismo ensayo para otros compuestos naturales derivados de plantas superiores, evaluados previamente por nuestro grupo de investigación (González-Burgos y col., 2012; Porres-Martínez y col., 2013). El fundamento del método ORAC se enmarca dentro del grupo de métodos HAT (*hydrogen atom transfer*), en que los RL se estabilizan por donación de un átomo de hidrógeno por parte de una molécula antioxidante. Esto explica la elevada actividad de los extractos liquénicos en este ensayo, ya que los compuestos fenólicos (cuya presencia ha sido cuantificada) pueden donar con relativa facilidad el átomo de hidrógeno de sus hidroxilos aromáticos, por verse favorecida la deslocalización de la carga en el anillo bencénico (Alov y col., 2015). Por tanto, en vista de estos resultados puede esperarse cierto efecto inhibidor de RL para los extractos en los modelos celulares en estudio. Por el contrario, los extractos liquénicos no han demostrado una actividad *scavenger* tan potente en el ensayo de captación del radical DPPH, en que el trolox muestra mayor actividad que todos ellos. El distinto comportamiento de las muestras en ambas pruebas puede deberse

a las diferencias en su fundamento, ya que el ensayo DPPH es de tipo ET (*electron transfer*); por tanto, la captación del radical DPPH se produce por transferencia de un electrón desde la molécula antioxidante, en reacciones que son más lentas, y muy dependientes del solvente y del pH (Apak y col., 2007).

Tras la realización de dichas pruebas químicas de actividad antioxidante, se evalúa la **actividad citoprotectora frente a EO** de los extractos metanólicos de las seis especies en estudio. Debido a que en la bibliografía científica no existen referencias previas a sus efectos en los modelos celulares de neurona y astrocito aquí utilizados, se determina en primer lugar el rango de concentraciones no citotóxicas para cada uno de ellos mediante los ensayos de reducción de MTT (indicador de actividad enzimática mitocondrial) y de actividad LDH (indicador de la integridad de membrana plasmática). Las concentraciones que no afectan a la viabilidad celular se seleccionan para, posteriormente, realizar el estudio de su actividad frente al modelo de EO. Se observa que el pre-tratamiento (24 h) de las dos líneas celulares (SH-SY5Y y U373-MG) con los extractos liquénicos resulta citoprotector frente al daño inducido por la posterior exposición a  $H_2O_2$ . Todos los extractos, en distinto grado, aumentan significativamente la viabilidad celular y atenúan los cambios morfológicos. Los extractos que ejercen un efecto citoprotector más significativo son los de *Evernia prunastri* y *Cetraria islandica*. Se seleccionan las concentraciones óptimas de cada extracto que ejercen una mayor citoprotección (en cada una de las líneas celulares) para ser evaluadas en los siguientes ensayos. En las células SH-SY5Y, las concentraciones óptimas están en el rango 0,25-0,5  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que en las U373-MG, estas concentraciones oscilan entre 2,5 y 25  $\mu\text{g/ml}$ ; cabe destacar aquí también las menores concentraciones utilizadas en las células del modelo neuronal, que muestran una mayor sensibilidad a los efectos de los extractos liquénicos.

El efecto de los extractos a esas concentraciones óptimas se evalúa frente a **marcadores de estrés oxidativo**, puesto que, como se ha comentado previamente, es éste el principal mecanismo de daño celular que desencadena el  $H_2O_2$ . El ensayo de la diclorofluoresceína permite determinar los efectos de los extractos sobre los **niveles de ERO intracelulares**. El aumento en la generación de ERO que provoca el  $H_2O_2$  se ve atenuado, en ambos modelos celulares, por el pre-tratamiento con los seis extractos metanólicos. Estos resultados demuestran que sus efectos citoprotectores están mediados, al menos en parte, por una disminución del EO intracelular. Se observa, además, que ninguna de los extractos altera *per se* los niveles intracelulares de ERO de forma significativa (ni ninguno de los marcadores de EO medidos y discutidos a continuación), que se encuentran en niveles muy similares a los niveles

basales presentes en células control, permitiendo afirmar que los tratamientos con los extractos no ejercen efectos pro-oxidantes en las condiciones establecidas.

En estrecha relación con la captación de radicales peroxilo demostrada en el ensayo ORAC, se cuantifican mediante HPLC las **concentraciones de malondialdehído** (MDA) como biomarcador del nivel de peroxidación de lípidos (y por tanto, del daño a las membranas biológicas) y los efectos de los extractos liquénicos sobre ese proceso. La peroxidación lipídica en células SH-SY5Y y U373-MG se encuentra elevada (más del doble) en células expuestas a  $H_2O_2$  respecto a las células control, en consonancia con los resultados de trabajos previos (González-Burgos y col., 2012; Ju y col., 2012). El pre-tratamiento con los extractos demuestra un efecto inhibitorio significativo de la formación de MDA como consecuencia de la exposición a  $H_2O_2$ . Los extractos de *Cetraria islandica* y *Evernia prunastri* son, en ese orden, los que presentan un mayor efecto protector frente a la peroxidación de lípidos de membrana debida a ERO. Nuestros resultados están en consonancia con estudios previos como el publicado por Alpsy y colaboradores (2015), que demuestran, para un extracto metanólico de *E. prunastri*, un efecto reductor de los niveles de MDA en linfocitos humanos en cultivo.

Por otro lado, se determinaron los **niveles de glutatión** por ser, en su forma reducida, el principal antioxidante no enzimático de las células del organismo, y con especial relevancia en el SNC (Martin y Teismann, 2009). Los resultados obtenidos demuestran que, en condiciones basales, las células control SH-SY5Y y U373-MG presentan una mayor concentración de la forma reducida GSH frente a forma oxidada GSSG, lo que se traduce en valores elevados del ratio GSH/GSSG. En el modelo de astrogliá se observa un ratio de valor 10 (mucho mayor al que presenta el modelo neuronal) que está de acuerdo a la mayor eficacia antioxidante del GSH en astrocitos descrita en la literatura científica, y a la función neuroprotectora que ejercen estas células mediante el aporte de precursores para la síntesis de GSH a las neuronas (Hirrlinger y Dringen, 2010; Lavoie y col., 2011). El potencial antioxidante de ambas líneas celulares se ve disminuido con la exposición a  $H_2O_2$ , que altera el estado redox a favor del GSSG. El pre-tratamiento (24 h) con los extractos de *Evernia prunastri* y *Cetraria islandica* previene significativamente la disminución del ratio GSH/GSSG causada por  $H_2O_2$ , manteniendo las concentraciones de GSH casi en niveles basales, lo que supone una mayor capacidad antioxidante en ambos modelos celulares. Este efecto puede explicar, en parte, la citoprotección frente a EO previamente demostrada. También resulta activo el extracto de *Usnea ghattensis* en células SH-SY5Y y el de *Vulpicida canadensis* en células U373-MG.

Una vez evaluadas las actividades citoprotectoras de los extractos, así como sus actividades antioxidantes y sus efectos sobre marcadores de EO, los resultados obtenidos indican la presencia de compuestos con importante actividad en los mismos. Como siguiente paso del trabajo, se procedió a su **estudio fitoquímico** empleando la técnica de HPLC, con el fin de identificar los componentes individuales de los distintos extractos. El método de elución en gradiente utilizado proporciona una adecuada resolución de los picos y separación de la línea base de todos los cromatogramas (Fernández-Moriano y col., 2015a). La detección mediante diodo array del espectro UV y el análisis de los tiempos de retención de los compuestos eluidos ha permitido identificar los compuestos mayoritarios que se encuentran en los extractos metanólicos (Tabla 25). Los resultados de la caracterización química concuerdan con trabajos previamente publicados.

Extracto	Compuestos identificados	Referencia
<i>Cetraria islandica</i>	Ácido fumarprotocetrárico (mayoritario), ácido protocetrárico (trazas)	OMS, 2004; Gudjónsdóttir y Ingólfssdóttir, 1997
<i>Cetrelia braunsiana</i>	Ácido $\alpha$ -colatólico (mayoritario), ácido alectorónico, atranorina	Luo y col., 2007
<i>Evernia prunastri</i>	Ácido evérnico (mayoritario), atranorina (trazas)	Avalos y Vicente, 1987; Kosanić y col., 2013
<i>Parmotrema saccatilobum</i>	Ácido protocetrárico (mayoritario), atranorina (trazas)	Joshi y col., 2009;
<i>Usnea ghattensis</i>	Ácido úsnico, ácido estíctico	Behera y col., 2009
<i>Vulpicida canadensis</i>	Ácido úsnico, ácido pinástrico, ácido vulpínico	Mattsson y Lai, 1993; Nash y col., 2001

Tabla 25. Compuestos identificados por HPLC en los extractos metanólicos de las seis especies de líquenes parmeliáceos, así como los artículos que respaldan los hallazgos de composición química en cada espécimen.

En base a los resultados de composición química, los extractos de *Cetraria islandica*, *Evernia prunastri* y *Parmotrema saccatilobum* contienen los compuestos ácido fumarprotocetrárico, ácido evérnico y ácido protocetrárico, respectivamente, como componentes mayoritarios (en torno a un 85-90%). En cambio, los extractos de *Cetrelia braunsiana*, *Usnea ghattensis* y *Vulpicida canadensis* presentan contenidos significativos de más de un compuesto.

Los resultados de actividad citoprotectora frente a EO discutidos previamente sugieren que los extractos de las especies *Evernia prunastri* y *Cetraria islandica* son los que presentan un mayor potencial neuroprotector, y proporcionan una base científica que justifica la investigación de sus **compuestos aislados** como agentes neuroprotectores. Además, ambos



extractos presentan un único componente mayoritario en su estudio fitoquímico. Se plantea, por tanto, el aislamiento de los compuestos identificados como ácido evérnico (de *E. prunastri*) y ácido fumarprotocetrárico (de *C. islandica*), a fin de profundizar en el estudio de sus actividades. El aislamiento de dichos metabolitos mayoritarios se realiza por una técnica de HPLC semi-preparativa, y se confirma la identidad de los productos aislados mediante el análisis de los espectros de RMN  $^1\text{H}$ , que coinciden con los publicados previamente para ambos compuestos (Narui y col., 1998; Su y col., 2003).

Además de los ácidos evérnico (EVE) y fumarprotocetrárico (FUM), seleccionamos la atranorina (ATR), por estar presente en tres de los seis extractos activos evaluados, y el ácido úsnico (USN), que está presente en dos de ellos y ha sido objeto de estudio previos por sus actividades farmacológicas, entre las que sobresalen las antimicrobianas (Cocchietto y col., 2002; Araújo y col., 2015). En la siguiente fase del trabajo se investiga el potencial neuroprotector de los cuatro compuestos aislados (Figura 75) en los mismos modelos celulares de EO, con el objetivo de conocer y profundizar en sus mecanismos de acción. Los cuatro compuestos presentan grupos fenólicos en su estructura, que pueden ser relevantes en el potencial antioxidante de líquenes, como se ha sugerido previamente (Odabasoglu y col., 2004).

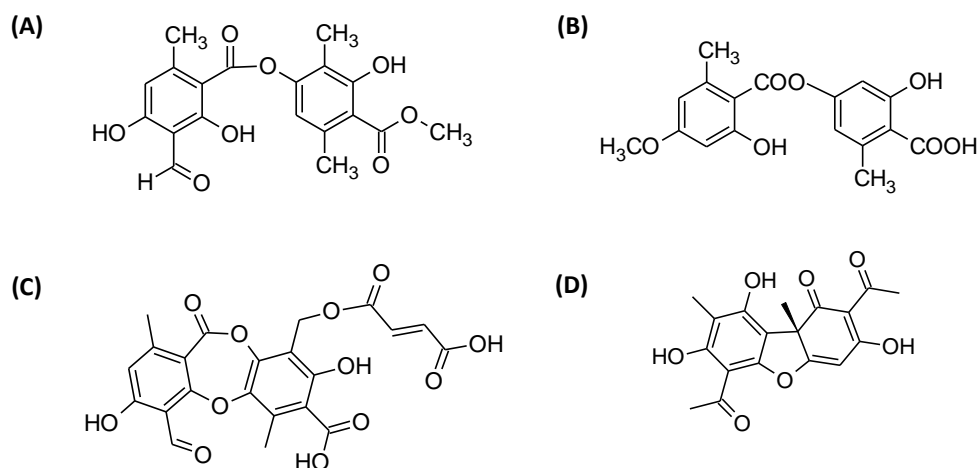


Figura 75. Estructuras químicas de los cuatro metabolitos secundarios investigados. (A) Atranorina: depsida; (B) ácido evérnico: depsida; (C) ácido fumarprotocetrárico: depsidona; (D) ácido úsnico: dibenzofurano.

De forma similar al estudio de los extractos, se determinan inicialmente las concentraciones de los cuatro compuestos que no afectan a la viabilidad normal de las líneas celulares SH-SY5Y (modelo de neurona) y U373-MG (modelo de astrocito) para posteriormente evaluar su capacidad de proteger, en pre-tratamientos de 24 h, frente a la citotoxicidad demostrada por  $\text{H}_2\text{O}_2$ . De entre los cuatro compuestos, USN es el que muestra una mayor

toxicidad concentración-dependiente y, por tanto, se seleccionan concentraciones menores del mismo. Mediante el ensayo de reducción de MTT, se observa que los cuatro compuestos ejercen efectos citoprotectores significativos sobre ambos tipos celulares, aumentando la actividad metabólica (como indicador de viabilidad celular) en comparación con las células sólo tratadas con  $H_2O_2$ . Se seleccionan, en este punto, las concentraciones óptimas de cada compuesto que ejercen el mayor efecto citoprotector, que se encuentran en un rango de 1 a 25  $\mu g/ml$ , y que son las que se utilizarán en los siguientes ensayos para profundizar en el estudio de su mecanismo neuroprotector. Se demuestra, además, que los compuestos (a dichas concentraciones óptimas) atenúan parcialmente, e incluso revierten, los cambios sobre morfología celular debidos a  $H_2O_2$ .

No existen estudios previos en la bibliografía científica con referencia a tales propiedades citoprotectoras de EVE y FUM, que son los dos compuestos que han demostrado la mayor actividad frente al EO en los dos modelos celulares derivados de SNC, incrementando la viabilidad celular en torno a un 20% (frente a la reducción ejercida por  $H_2O_2$ ). En cuanto a ATR, nuestros resultados están en consonancia con el estudio precedente de Melo y colaboradores (2011), que describe un efecto protector de un co-tratamiento con ATR en un modelo similar de EO inducido por  $H_2O_2$  en células SH-SY5Y. El USN también ejerce un efecto citoprotector moderado en ambos modelos celulares, de acuerdo con el estudio previo de De Paz y colaboradores (2010b), en que se evidencia un efecto equivalente en el modelo celular U373-MG. Sin embargo, nuestros datos se oponen a los mostrados por Rabelo y col. (2012), que aluden a la incapacidad de USN de proteger las células SH-SY5Y frente al daño oxidativo. Los resultados discutidos a continuación permiten elucidar mejor el potencial citoprotector del ácido úsnico.

Una vez demostrado su acción citoprotectora, se investiga el efecto de los compuestos aislados sobre los **marcadores de EO**, esto es, la generación intracelular de ERO, los niveles de MDA y el ratio GSH/GSSG. Ninguno de los compuestos aislados causa, a las concentraciones óptimas seleccionadas, una alteración de los mismos en comparación con las células control, indicando que no tienen *per se* efectos pro-oxidantes ni reaccionan con componentes del medio de cultivo favoreciendo la formación de ERO (Halliwell, 2003).

Cuando las células SH-SY5Y y U373-MG se someten a un pre-tratamiento (24 h) con los compuestos liquénicos, previamente a la inducción del daño oxidativo por  $H_2O_2$ , muestran un mejor estado redox, y las alteraciones en marcadores de EO se ven significativamente atenuadas. Los cuatro compuestos son capaces de reducir la producción intracelular de ERO y

de disminuir los niveles de MDA; el efecto más significativo lo manifiestan EVE y FUM (superior al del antioxidante de referencia trolox), siendo más moderado en los casos de ATR y USN. La actividad antioxidante frente a la peroxidación de lípidos prevendrá de las disrupciones estructurales y de función que acontecen en las membranas celulares con una elevada lipoperoxidación (genera pérdida de fluidez y alteración de la permeabilidad iónica) (Sultana y col., 2013). La capacidad de FUM para inhibir la peroxidación lipídica fue previamente sugerida por De Barros-Alves y colaboradores (2014). En esa misma línea, se ha descrito una protección eficaz del ácido úsnico frente al daño oxidativo en lípidos de membrana de eritrocitos humanos (Suwalsky y col., 2015). Por otro lado, EVE y FUM también potencian el sistema antioxidante glutatión en los modelos celulares de neurona y astrocito, atenuando la reducción del índice redox GSH/GSSG debida a  $H_2O_2$ . ATR y USN no tienen efecto directo sobre los niveles de GSH en los modelos celulares de SNC, si bien USN sí demostró aumentar *in vivo* los niveles de GSH en tejido gástrico (Odabasoglu y col., 2005).

En general, la actividad sobre marcadores de EO mostrada por los compuestos aislados está en consonancia con los obtenidos previamente para los extractos metanólicos, y explican la mayor actividad demostrada por *Evernia prunastri* y *Cetraria islandica*. Además, sugieren que los metabolitos liquénicos en estudio son capaces de interaccionar y penetrar las bicapas lipídicas para ejercer un efecto antioxidante a nivel intracelular, que supone un requisito fundamental para que un compuesto ejerza un efecto citoprotector eficaz (Zhao y col., 2004; Fadel y col., 2011). La actividad mostrada por FUM sobre los niveles de MDA o sobre el sistema glutatión podrían explicar la actividad frente a estrés oxidativo demostrada *in vivo* para un extracto de *Cetraria islandica* (Cernescu y col., 2011), en el que FUM es su principal metabolito secundario.

Los efectos sobre marcadores de EO, y en especial sobre la peroxidación lipídica, pueden relacionarse de forma directa con la capacidad *scavenger* frente a radicales peroxilo mostrada en el ensayo ORAC. Los compuestos aislados muestran una actividad antioxidante mayor que el trolox en este ensayo, destacando los valores ORAC de EVE y FUM (12,81 y 5,07  $\mu$ moles ET/mg muestra, respectivamente), que son también significativamente superiores a los mostrados por los extractos que los contienen. ATR y USN ejercen una actividad más moderada como *scavengers* de radicales peroxilo, en contra de lo descrito en estudios previos que apuntan a que estos dos compuestos actúan como pro-oxidantes aumentando los niveles de TBARS (*thiobarbituric acid reactive substances*), como marcador de peroxidación lipídica (Melo y col., 2011; Rabelo y col., 2012); por tanto, se puede concluir que la actividad de ATR y USN frente a estos radicales varía en función de las condiciones del ensayo. EVE es también el

compuesto más activo en la captación del radical DPPH, mostrando una interesante potencia antioxidante global.

Una vez evaluados los parámetros de actividad antioxidante directa, y a la vista de los positivos resultados, se pretende evaluar la posible implicación de un mecanismo indirecto como es la **inducción o potenciación del sistema antioxidante enzimático** en los efectos citoprotectores frente a EO de los compuestos liquénicos en estudio. Numerosos trabajos consideran los niveles de activación y expresión de enzimas detoxificadoras de ERO como un biomarcador importante del balance redox celular, y como diana de neuroprotección; entre ellas se incluyen: catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidada (GPx), glutatión reductasa (GR) y hemoxygenasa-1 (HO-1) (Jazwa y Cuadrado, 2010; Greco y Fiskum, 2010; Zhang y col., 2013). Por técnicas de Western blot, en el presente trabajo se demuestra que las células SH-SY5Y y U373-MG expuestas a la citotoxicidad por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presentan niveles reducidos de expresión proteica de todas las enzimas anteriormente mencionadas, en comparación con los controles (Porres-Martínez y col., 2013). Las células tendrán, por tanto, menor capacidad antioxidante y mayor susceptibilidad al daño biomolecular por ERO, y la consecuente muerte celular (Navarro-Yepes y col., 2014). Sin embargo, el pre-tratamiento de las células con los compuestos aislados, previamente a la inducción de EO, produce, en líneas generales, una inducción de la expresión de genes de enzimas antioxidantes en ambos modelos celulares, hallándose niveles de proteína significativamente superiores a los que se encuentran en células sólo tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Éstos resultados están en línea con investigaciones previas que demuestran la eficacia de ciertos metabolitos y extractos liquénicos (entre ellos USN) para regular, potenciándolo, el sistema antioxidante enzimático y proteger frente al EO en diversos modelos *in vitro* e *in vivo* no relacionados con el SNC (Halici y col., 2005; Bayir y col., 2006; Karakus y col., 2009; Tanas y col., 2010; Cernescu y col., 2011; Kotan y col., 2011; Alpsoy y col., 2013). Dichos hallazgos permiten explicar, además, la existencia de menores niveles de ERO intracelulares (discutidos anteriormente) tras los tratamientos con los compuestos, al potenciar la capacidad antioxidante endógena. El efecto más marcado sobre el sistema enzimático lo ejercen las concentraciones óptimas de EVE (5 µg/ml para las dos líneas celulares), seguido de FUM (1 µg/ml en células SH-SY5Y y 25 µg/ml en U373-MG). Ambos compuestos revierten de forma muy significativa la acción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, siendo capaces de inducir en algunos casos una expresión de las proteínas antioxidantes mayor a la de las células control. A la vista de estos resultados, parece evidente que el efecto de EVE y FUM sobre los niveles de GSH se debe, en parte, a su capacidad de potenciar la expresión de GPx y GR.

La expresión de los genes de enzimas antioxidantes de fase II (como las anteriormente estudiadas) está regulada, entre otras, por la **vía de señalización intracelular del factor de transcripción Nrf2** (Zhang y col., 2013), que se describe en detalle en la Revisión Bibliográfica de la presente memoria de Tesis. Trabajos previos indican que el nivel de activación de las distintas enzimas reguladas por Nrf2 puede diferir, dependiendo su grado de expresión proteica del modelo y condiciones experimentales del estudio (He y col., 2011); así puede explicarse los variables niveles de proteína hallados para las enzimas determinadas en este trabajo.

La liberación de Keap-1 en el citosol (donde está inactivo) por señales activadoras permite la translocación del factor Nrf2 al núcleo donde actúa regulando la transcripción génica por unión a la secuencia ARE en el ADN. Por tanto, puesto que la translocación es un pre-requisito esencial para ejercer su actividad, analizamos por técnicas de inmunoblot los niveles de Nrf2 tanto en las fracciones citosólicas como nucleares de las células de ambos modelos y bajo los distintos tratamientos. Los resultados obtenidos muestran que los pre-tratamientos con los compuestos en estudio motivan un aumento significativo de los niveles de Nrf2 nuclear respecto a las células expuestas a daño oxidativo por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (sin tratamiento previo). En las células tratadas con los compuestos liquénicos la expresión de Nrf2 nuclear es incluso superior a la de células control, sin modificar significativamente los niveles citosólicos, lo que indica que estos compuestos estabilizan el factor Nrf2 y favorecen su acumulación en el núcleo. En ambos modelos celulares, EVE ejerce el efecto más marcado sobre los niveles de Nrf2 nuclear, seguido de FUM, USN y ATR, en ese orden. Se demuestra así que los compuestos facilitan la presencia del factor en el núcleo, lo que no implica que se active la transcripción, pero sí es una condición previa.

En vista de esos resultados, para confirmar el papel de la vía Nrf2, evaluamos mediante un ensayo inmunoenzimático de ELISA la capacidad de unión del factor de transcripción al ADN, que se relaciona de forma directamente proporcional con la transcripción génica (Kuosmanen y col., 2016). Los datos obtenidos para dicho ensayo demuestran que el factor Nrf2 nuclear es significativamente menos activo para su unión al ADN (hasta el 25% menos) en las células SH-SY5Y y U373-MG tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en comparación con las células control. En cambio, el pre-tratamiento con los compuestos liquénicos revierte la pérdida de actividad de Nrf2 en ambos modelos celulares. El tratamiento celular con EVE (5 µg/ml, 24 h) supone, además, una actividad del factor Nrf2 de unión al ADN significativamente superior a las células control, sugiriendo una potente activación de esta vía de señalización, que se traduce en una mayor expresión de enzimas citoprotectoras de fase II. Los efectos demostrados para USN,

más moderados, están en consonancia con un estudio previo en modelo de células hepáticas (Chen y col., 2016). De forma general, los resultados aquí recogidos en referencia a la activación de la vía Nrf2 se pueden enmarcar en línea con numerosos trabajos precedentes que han sugerido que este mecanismo de acción está involucrado en las actividades neuroprotectoras *in vitro* demostradas para diversos compuestos naturales; entre ellos, se incluyen ciertos compuestos cuyas estructuras contienen grupos fenólicos (Romeo y col., 2009; Scapagnini y col., 2011; González-Burgos y col., 2013c; Singh y col., 2013; Zou y col., 2013).

Por otra parte, existe una sólida evidencia científica, tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*, que respalda la asociación entre el estrés oxidativo celular y la **disfunción mitocondrial**. Se trata de un evento patológico de especial relevancia en la degeneración neuronal característica de trastornos neurodegenerativos que supone, por ejemplo, la muerte de neuronas dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson (Schapira, 1998). La mitocondria es uno de los orgánulos celulares más susceptibles al EO, y el daño oxidativo a las biomoléculas que la conforman supone alteraciones en la estructura normal de las membranas externa e interna, el hinchamiento de la matriz y la pérdida de funcionalidad general (Detmer y Chan, 2007). Esto conlleva numerosas alteraciones en procesos celulares, ya que es el orgánulo que regula el metabolismo energético. Además, la disfunción debida a EO supone una mayor generación de ERO a nivel de estos orgánulos, que contribuye a la apertura del poro de transición mitocondrial (PTM) y empeora las consecuencias del EO (Bhat y col., 2013; Wang y col., 2013). Debido a esa estrecha relación, se busca evaluar en el presente trabajo el posible efecto de los compuestos liquénicos sobre la función mitocondrial. Con ese objetivo, se evalúa por un método fluorimétrico uno de los parámetros bioquímicos que se ve principalmente alterado en etapas tempranas de EO, como es el **potencial de membrana mitocondrial (PMM)**. Los datos experimentales demuestran que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provoca, a las elevadas concentraciones utilizadas en el presente trabajo, una pérdida significativa del PMM (en torno a un 40%) en las células SH-SY5Y y U373-MG, que puede deberse a alteraciones en la membrana mitocondrial por daño oxidativo a lípidos y proteínas de membrana, con pérdida de fluidez y de la permeabilidad selectiva a iones (Tangmansakulchai y col., 2016). Nuestros resultados demuestran que EVE y FUM ejercen un efecto protector sobre la pérdida del PMM en los modelos de neurona y astrogliá sometidos a EO, y sugieren cierta protección sobre la integridad de membrana mitocondrial.

El mantenimiento de una adecuada homeostasis de los iones calcio a nivel intracelular es un factor clave para la viabilidad neuronal y se ha demostrado alterada en el SNC de pacientes de enfermedades neurodegenerativas (Zündorf y Reiser, 2011). Se ha descrito la

implicación de niveles anormales de ERO en la alteración de los transportadores iónicos que regulan la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , así como en la liberación de iones  $\text{Ca}^{2+}$  de almacenes intracelulares (p. ej., el retículo endoplasmático), que suponen una ruptura de dicha homeostasis (Zhang y col., 2016). Además, la funcionalidad mitocondrial es muy importante por su contribución al equilibrio intracelular adecuado del calcio. En condiciones fisiológicas, el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior mitocondrial está finamente regulado por transportadores iónicos (p. ej., uniportadores de  $\text{Ca}^{2+}$ , intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , etc.) y estimula la respiración mitocondrial y síntesis de ATP, y las mitocondrias pueden actuar como almacenes de  $\text{Ca}^{2+}$  para combatir ligeros incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Sin embargo, en situaciones de EO, la afectación de la membrana mitocondrial conlleva una sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  en el interior del orgánulo, induciendo la sobre-producción de ERO y el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. Todo ello agrava la disfunción mitocondrial y puede mediar la pérdida del PMM, apertura del PTM y la disociación del citocromo C de la membrana mitocondrial, que desencadena la apoptosis (Contreras y col., 2010; Duchen, 2012; Giorgi y col., 2012).

En este contexto, se aborda el estudio del efecto de los compuestos liquénicos sobre los **niveles de calcio mitocondrial y citosólico**, mediante la utilización de sondas catiónicas fluorescentes específicas. En línea con trabajos previos, nuestros resultados demuestran que la exposición de las células SH-SY5Y y U373-MG a  $\text{H}_2\text{O}_2$  conduce a un aumento significativo en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y de la permeabilidad mitocondrial al  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos efectos explican, junto a la mayor producción de ERO y la pérdida de PMM anteriormente demostradas, la disfunción mitocondrial y la neurotoxicidad debida a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Bajić y col., 2013; González-Burgos y col., 2013c). Sin embargo, el tratamiento (24 h) de ambos modelos celulares con las concentraciones óptimas de cada compuestos liquénico no evidencia ninguna alteración en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , manteniendo niveles citosólicos y mitocondriales muy similares a las células control. Si el pre-tratamiento con los compuestos en estudio es anterior a la exposición a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sí ejercen una atenuación significativa de la disrupción de la homeostasis del calcio debida a EO. De este modo, los compuestos ATR, EVE, FUM y USN revierten el aumento de las concentraciones citosólicas de  $\text{Ca}^{2+}$  (a excepción de ATR en el modelo neuronal de células SH-SY5Y), lo que puede explicarse por sus efectos antioxidantes demostrados al inicio del trabajo, y que previenen de la acción de las ERO sobre los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . Además, resulta muy interesante observar la actividad de EVE y FUM en la prevención de la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial que ocurre en los modelos celulares de neurona y astrocito por exposición a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Junto a los resultados del ensayo de PMM, estos datos sugieren un efecto protector específico sobre la mitocondria para estos dos metabolitos liquénicos, que se traduce en una

mejor funcionalidad mitocondrial y mayor viabilidad celular en situaciones de EO. El efecto protector a nivel de la mitocondria está directamente relacionado con la capacidad de estos compuestos para inhibir la producción de ROS intracelulares, que a su vez está mediado, al menos en parte, por la activación de la vía del factor de transcripción Nrf2. Éste es el primer estudio que evalúa el efecto de compuestos derivados de líquenes sobre marcadores de función mitocondrial, pero los datos obtenidos están en consonancia con estudios precedentes sobre compuestos fenólicos en plantas superiores que, por sus acciones a nivel mitocondrial, median efectos neuroprotectores (Horáková, 2011; Albarracín y col., 2012; Ferretta y col., 2014; Kumar y Singh, 2015).

Tal y como se expuso en la Revisión Bibliográfica, la muerte celular que acontece como consecuencia del daño oxidativo en el SNC durante la neurodegeneración se produce fundamentalmente por mecanismos de **apoptosis** (Radi y col., 2014). En una situación de excesivos niveles de ERO, cobra especial relevancia la vía intrínseca de la apoptosis que está mediada por mitocondria (Harrison y col., 2005; Martin, 2010). Como continuación a los ensayos sobre función mitocondrial, se pretende evaluar los efectos de los compuestos liquénicos en estudio sobre el proceso de apoptosis. Numerosos trabajos describen la inducción de la apoptosis por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en diversos modelos celulares, entre los que se incluyen los modelos de neurona y astrogliá utilizados en el presente trabajo (Shing y col., 2007; Shing y col., 2011; Porres-Martínez y col., 2013; Uğuz y col., 2016).

La enzima caspasa-3 es la principal enzima efectora de la apoptosis en que confluyen las vías extrínseca e intrínseca del proceso. Su actividad enzimática se utiliza como marcador directo de la apoptosis y se ha demostrado incrementada en la muerte celular en SNC debida a EO (Louneva y col., 2008; Płóciennik y col., 2015). Los resultados del ensayo fluorimétrico confirman una actividad caspasa-3 aumentada (en más de un 200%) en los dos modelos de células SH-SY5Y y U373-MG bajo las condiciones de EO establecidas (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno). Por el contrario, en las células pre-tratadas con los cuatro compuestos liquénicos en estudio, se observa una disminución significativa de la escisión del sustrato fluorogénico Ac-DEVD-AMC que indica una menor actividad caspasa-3. El orden de inhibición de la actividad enzimática en ambos modelos celulares es: EVE > FUM > USN > ATR. Cabe destacar un mayor efecto anti-apoptótico en el modelo de células neuronales SH-SY5Y, donde EVE es capaz de revertir la inducción de la actividad enzimática por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hasta niveles de actividad similares a los basales en células control. El hallazgo de una menor apoptosis tras el pre-tratamiento con los compuestos liquénicos, así como la intensidad de los efectos de los distintos compuestos,



concuera con los resultados de citoprotección frente a  $H_2O_2$  obtenidos en el ensayo de MTT. La citoprotección se explica por sus actividades antioxidantes anteriormente discutidas, ya que al reducir los niveles de ERO y el daño oxidativo, se reduce la disfunción mitocondrial y todo ello se traduce en una menor apoptosis celular. El ensayo de actividad caspasa-3 confirma, además, que los compuestos en estudio (concentraciones óptimas, 24 h), no inducen por sí solos una mayor muerte celular; los niveles de actividad caspasa-3 son casi idénticos a los encontrados en células control.

En esta línea, se continúa el trabajo a fin de profundizar en el estudio del efecto protector de los compuestos liquénicos frente a la apoptosis inducida por  $H_2O_2$ . En condiciones de homeostasis celular, la enzima caspasa-3 se encuentra mayoritariamente en forma inactiva (pro-enzima) y presenta un peso molecular de 32 KDa; para ejercer su acción durante el proceso de apoptosis, debe escindirse, y su forma activa tiene un peso molecular de 17 KDa. Una supresión de su activación sería también un signo de protección frente a la apoptosis (Elmore, 2007; Bressenot y col., 2009). Con el objetivo de evaluar dicha activación, se utiliza la técnica de Western blot para medir los niveles proteicos de la forma activa de la caspasa-3. Los resultados permiten confirmar una atenuación significativa en la expresión de la proteína activa bajo el pre-tratamiento con los compuestos liquénicos en los modelos celulares de neurona y astrocito. Este hallazgo respalda la existencia de una menor actividad enzimática efectora de la apoptosis. Paralelamente, se han medido los niveles de expresión de dos factores proteicos pertenecientes a la superfamilia de proteínas Bcl-2 que juegan un papel clave en la regulación de la vía intrínseca de la apoptosis. En concreto, la proteína Bcl-2 es un factor anti-apoptótico que se localiza en la membrana mitocondrial externa y su contenido se ve reducido cuando existe disfunción mitocondrial con disrupción de membrana; por el contrario, la proteína pro-apoptótica BAX es de localización citosólica, pero cuando se activa es reclutada a la membrana mitocondrial externa, y favorece la muerte celular por pérdida de PMM y liberación de citocromo C al citosol (Galluzi y col., 2009; Chong y col., 2014). Los resultados del presente trabajo demuestran un patrón pro-apoptótico tras la exposición de las células SH-SY5Y y U373-MG a  $H_2O_2$ , con un aumento significativo en la expresión de BAX y una disminución en la de Bcl-2, respecto a células control. En consonancia con los resultados de actividad y expresión de la caspasa-3, se observa que el pre-tratamiento con los compuestos liquénicos revierte el estado pro-apoptótico debido a EO en los dos modelos celulares, lo cual se evidencia en una disminución significativa de la expresión de BAX y un incremento en los niveles proteicos de Bcl-2 (respecto a las células sólo expuestas a  $H_2O_2$ ). EVE y FUM muestran los efectos anti-apoptóticos más marcados, mientras USN y ATR tienen efectos moderados, de

acuerdo con los resultados sobre marcadores de EO y disfunción mitocondrial discutidos anteriormente.

En estrecha relación con el mecanismo de apoptosis se encuentra el proceso de **autofagia** celular (Gump y Thorburn, 2011). En la última década, diversos estudios han descrito la implicación de defectos en la autofagia, entendida como un mecanismo de reciclaje de moléculas dañadas (por causas como el EO), en la etiología y el progreso de la muerte neuronal por apoptosis que ocurre en las enfermedades neurodegenerativas (Mishuzima y col., 2008; Ghavami y col., 2014; Otten y col., 2016). Se trata, además, del único mecanismo celular que permite la eliminación de mitocondrias completas, por lo que cobra especial relevancia en situaciones de disfunción mitocondrial (East y Campanella, 2016), como las planteadas en el presente estudio. Por tanto, la modulación de la autofagia emerge recientemente como una diana potencial en estrategias de neuroprotección; de forma general, se considera que un aumento de la autofagia disminuye la muerte por apoptosis (Wang y col., 2012; Xu y col., 2013; Baek y col., 2014; Zhou y col., 2014; Sureshbabu y col., 2016). Como último paso en el estudio del potencial neuroprotector de los compuestos liquénicos, se plantea la evaluación de su efecto sobre el flujo autofágico en el modelo neuronal de células SH-SY5Y. Con este fin, se cuantifican por Western blot los niveles intracelulares de dos proteínas de gran relevancia en el mecanismo molecular de la autofagia: LC3-I y LC3-II. Tal y como se ha descrito en apartados anteriores, LC3-I es la forma citosólica inactiva, mientras que LC3-II es la forma conjugada a fosfatidiletanolamina que se asocia a la membrana del autofagosoma y, por tanto, sus niveles se correlacionan directamente con el número de autofagosomas (Klionsky y col., 2012). Mayores niveles de LC3-II en presencia de un inhibidor de las fases tardías de la autofagia indican que hay una activación del proceso (Tanida y col., 2008).

Nuestros resultados demuestran que, en situaciones de EO inducido por  $H_2O_2$ , las células SH-SY5Y muestran niveles ligeramente elevados de autofagia, respecto al estado basal (células control). Esto puede comprenderse en un contexto de mayor daño oxidativo a biomoléculas a nivel intracelular, que requiere de un mayor flujo autofágico para su reciclaje. Estudios previos ya habían apuntado a la capacidad del  $H_2O_2$ , y el EO que genera, de activar la autofagia (Byun y col., 2009; Zhang y col., 2009; Zhang y col., 2013; Yin y col., 2015). Tal y como se ha demostrado anteriormente, ese incremento de autofagia no es suficiente para evitar la muerte celular en las condiciones usadas en el presente trabajo, sino que el daño oxidativo desencadena finalmente una mayor apoptosis. Sin embargo, los resultados de

inmunohistoquímica revelan que el tratamiento de las células SH-SY5Y con EVE y FUM (24 h, concentraciones óptimas), solos y/o con posterior exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, es capaz de incrementar significativamente (hasta un 200%) los niveles de LC3-II en presencia de un inhibidor de autofagia; ATR y USN no ejercen semejante acción. El prometedor efecto de activación de la autofagia para EVE y FUM, junto a los resultados de inhibición de la apoptosis, de protección a nivel mitocondrial y de propiedades antioxidantes, ayuda a comprender mejor sus actividades neuroprotectoras en situaciones de EO. Así, se entiende que su potencial neuroprotector es resultado de sus acciones sobre distintos procesos celulares, en línea con trabajos previos sobre compuestos de origen natural, que incluyen varios compuestos fenólicos (Filomeni y col., 2012; Deng y col., 2013; Lin y col., 2014).

Llegados a este punto, una visión global de todos los resultados anteriormente discutidos sugiere que las acciones antioxidantes de los metabolitos liquénicos en estudio puede proteger a las células SH-SY5Y y U373-MG del estrés oxidativo y la citotoxicidad inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Según se ha demostrado experimentalmente, estos compuestos actuarían inhibiendo la producción intracelular de ERO y la peroxidación lipídica, atenuando la reducción de los niveles de GSH, así como aumentando la expresión de diversas enzimas antioxidantes endógenas a través de la activación de la vía de señalización intracelular del factor Nrf2. Por otro lado, los compuestos liquénicos ejercen importantes acciones protectoras a nivel mitocondrial, reduciendo la disipación del potencial de membrana y minimizando las alteraciones en la homeostasis del calcio; EVE y FUM incluso son capaces de potenciar la actividad de la autofagia en las células neuronales. El conjunto de estas acciones tiene como resultado final la prevención de la apoptosis en células derivadas de SNC, y evitarían las consecuencias patológicas derivadas de las ERO, que acontecen de forma específica en la patogenia de diversas enfermedades neurodegenerativas. Si se compara la eficacia citoprotectora de los cuatro metabolitos liquénicos en estudio frente al EO en células de SNC, se observa un patrón de actividad muy similar de los cuatro poliquétidos sobre los modelos celulares de neurona y astrogliá. EVE ha sido el compuesto más activo en casi todos los ensayos, seguido de FUM. USN ha demostrado efectos más moderados, y ATR ha sido el compuesto menos activo.

Los compuestos activos que ejercen su efecto a nivel de SNC deben atravesar la **barrera hematoencefálica**, lo cual es un requisito que limita en muchos casos la efectividad de los mismos. Las propiedades físicas y metabólicas de la BHE la convierten en una barrera con una permeabilidad muy selectiva al transporte de sustancias, que limita el paso de casi la totalidad

de grandes moléculas (> 600 Da), y un grandísimo porcentaje de moléculas más pequeñas. Así, numerosos fármacos con resultados prometedores en fases pre-clínicas han visto muy limitado su potencial terapéutico por la escasa penetración al SNC. En este sentido, los estudios farmacocinéticos para verificar el paso a través de la BHE cobran especial relevancia en el desarrollo de potenciales terapias neuroprotectoras y de fármacos con otras acciones a nivel de SNC (Gabathuler, 2010; Morales y col., 2016; Trippier, 2016). Son también importantes para identificar potenciales efectos secundarios de fármacos con acción terapéutica en otros órganos pero cuyo paso a SNC media efectos indeseados, y del paso de neurotoxinas presentes como contaminantes en alimentos o en el medio ambiente (Di y Kerns, 2015).

En relación con los productos naturales, a pesar del descubrimiento de numerosas moléculas activas a nivel de SNC, han sido muy pocos los ensayos dirigidos a evaluar su capacidad de paso a través de la BHE en las etapas iniciales del desarrollo de fármacos, y no ha sido hasta los últimos años en que se ha incrementado la relevancia de estas investigaciones (González-Burgos y col., 2013a; Könczöl y col., 2013; Vareed y col., 2014; Veryser y col., 2016). Una vez demostrado el potencial antioxidante y neuroprotector de los compuestos liquénicos en estudio, se plantea evaluar su capacidad de paso a través de la BHE, sobre la que no existen estudios previos en la bibliografía científica. Mediante la utilización de técnicas *in vitro* con modelos celulares de endotelio vascular, se analiza su potencial capacidad de permear por difusión pasiva desde la sangre hasta el interior cerebral, por vía transcelular o paracelular, que son los mecanismos más relevantes en el transporte de moléculas activas al interior del SNC.

En base a la utilidad de los estudios *in silico* para predecir propiedades de paso a través de BHE de distintas moléculas (Abbott y col., 2008; Palmiotti y col., 2014), en una primera fase utilizamos diversas herramientas bioinformáticas (ALOGPS 2.1., Molinspiration y Daylight Chemical) con el objetivo de determinar las propiedades físico-químicas de los compuestos y descriptores moleculares estrecha relación con dicha permeabilidad. Estudios previos apuntan a que el paso de moléculas desde la sangre al cerebro por mecanismos de difusión pasiva es directamente proporcional a la lipofilia de las moléculas e inversamente proporcional al peso molecular, la presencia de carga, el área topológica de la superficie polar (TPSA) y a la capacidad de unión a iones hidrógeno (Mensch y col., 2009; Carpenter y col., 2014). En la bibliografía científica se encuentran algunas “reglas” que deben cumplir las moléculas para conseguir una efectiva permeabilidad a través de la BHE por difusión pasiva, todas ellas basadas en resultados de ensayos *in vivo*. Por ejemplo, se han planteado los siguientes

requerimientos: peso molecular  $\leq 450$  Da, suma de átomos de O y N en la molécula (aceptores de enlaces de hidrógeno)  $\leq 5$ , TPSA  $\leq 90$  Å, y el valor de  $[\log P - (\text{suma de átomos de N y O})] > 0$  (Van de Waterbeemd y col., 1998; Norinder y Haeberlein, 2002). A excepción del ácido fumarprotocetrárico, los poliquétidos liquénicos en estudio cumplen la premisa de un peso molecular reducido. No obstante, todas ellas son moléculas que presentan un número considerable de átomos de oxígeno y, con ello, se dificulta el cumplimiento de alguno de los otros parámetros. La presencia de un número significativo de átomos aceptores de enlaces de hidrógeno podría, en principio, limitar su capacidad de permear al SNC. Si se analiza el perfil farmacocinético de los cuatro compuestos liquénicos, sobresalen las propiedades del ácido evérnico, que es el compuesto que presenta un menor peso molecular, una mayor lipofilia (mayor Log P), menor TPSA y menor número de átomos aceptores de enlaces de hidrógeno. Se observa, en general, una mayor lipofilia en las estructuras tipo depsida (ATR y EVE), respecto a las depsidonas (FUM) y dibenzofuranos (USN). Comparando con las otras tres moléculas, las propiedades más favorables de EVE pueden deberse a su menor peso molecular y menor número de átomos de oxígeno. Por otro lado, cabe destacar que, a rasgos generales, los cuatro compuestos liquénicos cumplen la llamada “regla de los 5” (peso molecular  $< 500$ Da, átomos aceptores de enlaces de hidrógeno  $< 10$ , átomos donadores  $< 5$ , y  $\log P < 5$ ), que se considera como el requisito esencial para una buena biodisponibilidad oral de un fármaco, con adecuada absorción intestinal (Lipinski y col., 2001; Veber y col., 2002).

En cualquier caso, todos los parámetros mencionados deben de considerarse en conjunto y no por separado, y hay que tener en cuenta las limitaciones de los estudios *in silico*, que son fundamentalmente predictivos. La estimación de las propiedades de una molécula para atravesar la BHE por este tipo de estudios puede no ser definitiva, y así, estudios experimentales han demostrado que moléculas *a priori* con características idóneas para su transporte por mecanismos de difusión pasiva no consiguen atravesar la BHE, donde entran en juego otras características biológicas y farmacocinéticas (p. ej., metabolismo de primer paso y transportadores de eflujo en la BHE, entre otras) (Bodor y Buchwald, 2003; Shityakov y col., 2013). Por ello, una vez caracterizado el perfil farmacocinético *in silico*, se han realizado dos **ensayos experimentales *in vitro* de captación por células endoteliales (línea celular RBE4) y de permeabilidad a través de un modelo de BHE (línea celular hCMEC/D3).**

La línea celular RBE4 se emplea como un modelo de células con propiedades específicas de endotelio vascular (p. ej., marcadores enzimáticos y transportadores de membrana) de capilares cerebrales y ampliamente utilizada en estudios bioquímicos y de captación de

compuestos por BHE (Roux y Couraud, 2005; Heggland y col., 2009; Baghirov y col., 2016). Los estudios realizados en dicho modelo demuestran que los compuestos liquénicos son captados por las células endoteliales de forma concentración y tiempo dependiente, detectándose las máximas concentraciones intracelulares a la mayor concentración y mayor tiempo de ensayo. En resumen, cabe destacar que la cinética de captación de los compuestos liquénicos por las células endoteliales es saturable a altas concentraciones, existiendo una mayor eficacia de la captación del compuesto durante las primeras seis horas de tratamiento. Si se compara entre los compuestos en estudio, el ácido evérnico es el compuesto que presenta la mayor captación, seguido del ácido úsnico y del ácido fumarprotocetrárico. La menor concentración intracelular corresponde a atranorina.

Para los estudios de permeabilidad a través de BHE se utiliza la línea celular hCMEC/D3, que ha surgido recientemente como un adecuado modelo *in vitro* (Weksler y col., 2013). Las células hCMEC/D3, a diferencia de las RBE4, presentan uniones estrechas entre ellas, lo que supone una característica fundamental para un estudio de permeabilidad. Frente a otros modelos *in vitro* de BHE disponibles, el aquí seleccionado presenta como principal ventaja la reproducción de muchas de las características fundamentales de las células endoteliales primarias de BHE humana sin necesidad de co-cultivarse con células gliales (que en otros modelos liberan factores que favorecen la expresión de transportadores y la formación de uniones estrechas). Se ha demostrado que existe una buena correlación entre los resultados de permeabilidad *in vitro* utilizando este modelo celular con los que se dan *in vivo* (Poller y col., 2008). Una vez confirmada la integridad de la monocapa de células en cultivo por valores de TEER y de permeabilidad de lucifer yellow (Markoutsy y col., 2011; Bhupathiraju y col., 2014), se ha desarrollado el estudio de permeabilidad de los compuestos liquénicos utilizando las condiciones de tiempo y concentración que demostraron la mayor captación intracelular en el ensayo previo: 24 h y 5 µg/ml. Los valores de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ) obtenidos para los cuatro compuestos liquénicos en estudio son variables, pero siguen el mismo patrón que los resultados de captación por células endoteliales, lo que sugiere que el transporte de estas moléculas a través de BHE se produce por vía transcelular, con una captación inicial por la membrana luminal (en contacto con la sangre). EVE es el compuesto que presenta la mayor capacidad de difusión en la dirección absorptiva apical-basal (que mimetiza el paso de sangre a cerebro), con un valor de  $P_{app}$  de  $3,045 \times 10^{-6}$  cm/s. Estudios previos sobre permeabilidad de compuestos naturales establecieron que valores de  $P_{app}$  superiores a  $3 \times 10^{-6}$  cm/s suponen una permeación efectiva a través de la BHE (Madgula y col., 2010), lo que sugiere que EVE puede atravesar eficientemente la BHE y ejercer sus acciones a nivel de SNC. De nuevo, USN

presenta el segundo mayor valor de  $P_{app}$  (menos de la mitad del valor de EVE), seguido de FUM, y ATR es el compuesto con menor efectividad en la permeabilidad.

Estudios previos de nuestro grupo de investigación han establecido correlaciones entre el valor de  $P_{app}$  y los diferentes parámetros físico-químicos determinantes para el paso de compuestos por mecanismos de difusión pasiva (transcelular), destacando que la relación más significativa se establece con la lipofilia, que puede considerarse un parámetro determinante de la capacidad de estos compuestos para atravesar la BHE (González-Burgos y col., 2013a). La mayor lipofilia de EVE ( $\log P$  3,68), en comparación con el resto de poliquétidos estudiados, explicaría su mayor permeabilidad a través de la monocapa de células de BHE, así como que una mayor fracción del mismo quede retenida en las células endoteliales. El carácter lipófilo de la molécula de EVE puede compensar otras propiedades físico-químicas menos favorables, como el alto número de enlaces rotables (5) y de átomos aceptores de enlaces de hidrógeno (7). A la vista de esos datos de permeabilidad y captación, también podría explicarse que EVE sea el compuesto más activo en los ensayos de potencial neuroprotector, ya que penetraría en mayor medida al interior de las células SH-SY5Y y U373-MG (por su mayor carácter lipófilo que permite atravesar barreras plasmáticas).

Por otra parte, se ha llevado a cabo una aproximación al **estudio del potencial anticancerígeno** de los extractos metanólicos y compuestos aislados, con el objetivo de realizar una más completa caracterización del perfil farmacológico de las seis especies de líquenes parmeliáceos objeto del presente trabajo de Tesis. Para ello, se utilizan dos líneas celulares derivadas de cánceres humanos: línea HepG2 (modelo de carcinoma hepatocelular) y línea MCF-7 (modelo de adenocarcinoma de mama). Se realiza un ensayo de viabilidad a fin de evaluar la capacidad de las muestras líquénicas para ejercer citotoxicidad sobre dichas células (ensayo de reducción de MTT, tratamientos de 24 h).

Son diversos los estudios previos que apuntan a una interesante actividad anticancerígena de determinadas especies de líquenes, entre las que se incluyen algunas de la familia *Parmeliaceae* (Bucar y col., 2004; Burlando y col., 2009; Mitrovic y col., 2011; Xu y col., 2014). En línea con esos trabajos, se obtienen aquí resultados interesantes de citotoxicidad frente a las líneas HepG2 y MCF-7. En líneas generales, las células modelo de cáncer de mama se muestran más sensibles a la citotoxicidad ejercida por las muestras líquénicas (tanto extractos como compuestos aislados), que presentan un efecto citotóxico concentración-dependiente en ambos modelos celulares.

Los datos obtenidos en estudios de viabilidad celular señalan que los extractos más activos para inhibir el crecimiento y el número de células cancerígenas viables en ambos modelos son los correspondientes a *Usnea ghattensis* y *Vulpicida canadensis*; sobre esta última especie existe una referencia previa a su potencial anticancerígeno, por la inhibición del crecimiento de células Raji (derivadas de linfoma de Burkitt) (Shrestha y col., 2015). Estos dos extractos son significativamente citotóxicos a concentraciones relativamente bajas (desde 5 µg/ml en el caso de las células MCF-7), mostrando los menores valores de CL<sub>50</sub>. La actividad antiproliferativa de los extractos de *U. ghattensis* y *V. canadensis* puede correlacionarse con su alto contenido en ácido úsnico. De entre los cuatro en estudio, este compuesto aislado ha demostrado los efectos citotóxicos más significativos en ambas líneas celulares cancerígenas; especialmente interesante es la disminución de la viabilidad que ejerce sobre las células de cáncer hepático, donde presenta una CL<sub>50</sub> muy baja (14,29 µg/ml). El ácido úsnico es el compuesto derivado de líquenes que ha sido más ampliamente investigado en las últimas dos décadas por su potencial anticancerígeno; ha demostrado, por ejemplo, capacidad para inhibir el crecimiento de las líneas celulares cancerígenas T-47D y Capan-2 inhibiendo la síntesis del ADN celular (Einarsdóttir y col., 2010), y ha demostrado actividad inhibitoria de la migración y motilidad de células derivadas de cáncer de pulmón mediante la modulación de la expresión de diversos genes (Yang y col., 2016).

En la actualidad, existe una creciente evidencia científica que apoya la implicación de las ERO y el EO en la etiología de neoplasias como el cáncer de mama, de colon o de recto, que se relacionan con la peroxidación lipídica y la formación de aldehídos tóxicos (Owen y col., 2000). A este respecto, los compuestos fenólicos pueden atenuar el potencial carcinógeno mediante la captación de ERO y detención de la peroxidación lipídica. De hecho, se ha descrito una correlación positiva entre el contenido fenólico y las actividades citotóxicas frente a líneas celulares cancerígenas de algunas plantas superiores (Atmani y col., 2011; Rajkumar y col., 2011). Por tanto, las acciones citotóxicas del ácido úsnico (con el efecto anticancerígeno más relevante de los demostrados en el presente trabajo) podrían explicarse por mediación de sus actividades antioxidantes anteriormente evaluadas.

En la etapa final del trabajo, se ha realizado un **estudio genómico de la especie *Cetraria islandica***, como productora de un metabolito secundario de interés farmacológico: el ácido fumarprotocetrárico (FUM). Sobre este compuesto, se han demostrado en las fases previas de nuestro estudio prometedoras propiedades antioxidantes y citoprotectoras frente a EO, que lo presentan como un potencial agente neuroprotector. El objetivo de la estrategia genómica



consiste en identificar (o acotar el número de candidatos) el gen que probablemente codifica para la enzima que, en última instancia, sintetiza FUM. Tras conseguir un cultivo puro del micobionte de *C. islandica*, se realiza el análisis fitoquímico del mismo. Se ha descrito la gran influencia que ejerce la presencia del fotobionte en el metabolismo de las células del micobionte, de manera que algunos micobiontes en cultivo pueden no sintetizar los compuestos que sí se presentan en el líquen en la naturaleza, o incluso sintetizar compuestos diferentes (Oksanen, 2006). Los resultados del análisis por HPLC permiten verificar la síntesis de FUM en el cultivo, lo que indica que, bajo las condiciones de cultivo establecidas, hay una transcripción y expresión activa del gen/genes involucrados en su biosíntesis en las células del micobionte.

Seguidamente, se secuencian el ADN genómico del micobionte de *C. islandica* y, tras el tratamiento bioinformático de las secuencias de bases obtenidas, se consigue un ensamblaje *de novo* del genoma que presenta una longitud total (62,5 Mb) superior a la que podría esperarse (en torno a 40 Mb) en base a los datos sobre genomas fúngicos disponibles en la literatura científica (Nowrousian y col., 2010; McDonald y col., 2013). Esto podría indicar la existencia de duplicidades de genes y un pobre ensamblaje debido a deficiencias en la calidad de las secuencias de ADN obtenidas (Niu y col., 2010). Sin embargo, se ha demostrado mediante el análisis filogenético de secuencias KS que no existen duplicidades en estos genes, por lo que la mayor longitud del genoma puede atribuirse a la presencia de diferentes haplotipos en el cultivo multi-espórico original, que resulta en un ensamblaje más fragmentado (Simão y col., 2015), pero de calidad óptima para el objetivo marcado en este trabajo, ya que presenta un grado de completitud del 94%. Además, el valor de N50 del genoma de *C. islandica* (95,2 Kb), como un indicador métrico de la calidad del ensamblaje, es muy superior al publicado para otros genomas de micobiontes líquénicos (Abdel-Hameed y col., 2016). Por tanto, se lleva a cabo el análisis predictivo por AntiSMASH sobre los *scaffolds* asignados taxonómicamente a *Parmeliaceae*, a fin de identificar los *clusters* biosintéticos presentes en el genoma.

Tal y como se ha indicado anteriormente, el ácido fumarprotocetrárico es un poliquétido que presenta una estructura de depsidona formada por tres ciclos, que incluye hasta cinco grupos carbonilo no reducidos (Figura 76). Los poliquétidos líquénicos se sintetizan en las células del micobionte por la vía del acetato-polimalonato, y las principales enzimas involucradas en su síntesis son las poliquétido sintetasas (PKS). En particular, son las PKS tipo I no

reductoras las encargadas de los pasos clave de la síntesis de depsidas y depsidonas oxidadas, como es el caso de FUM (Kroken y col., 2003; Stocker-Worgötter, 2008; Wang y col., 2014).

De los 51 *clusters* biosintéticos identificados como PKSs por AntiSMASH, sólo 9 cumplen los requisitos de contener los dominios mínimos que caracterizan a una enzima PKS funcional (KS, AT y ACP) y de carecer de los dominios DH, KR y ER, determinando el carácter no reductor del enzima (Hopwood, 1997; Bingle y col., 1999). Los resultados del informe del análisis con BLAST (proporciona el grado de identidad y similitud con genes homólogos descritos y depositados en GenBank) revelan que, de los 9 genes PKS tipo I no reductor, sólo uno de ellos exhibe una similitud significativa con otro gen PKS previamente descrito en líquenes. Este *cluster* candidato se encuentra en el *scaffold* número 270 y presenta un 66% de similitud de genes con el *cluster* biosintético de *Cladonia grayi* que incluye un gen PKS previamente identificado como responsable de la síntesis de ácido grayánico (Armaleo y col., 2011). En vista de esos resultados y de la semejanza de las estructuras de los ácidos fumarprotocetrárico y ácido grayánico (Figura 76), ambos depsidonas, planteamos la hipótesis de que ambos compuestos pueden ser sintetizados por *clusters* biosintéticos similares en estructura, y que, por tanto, el cluster anotado en el *scaffold* 270 pueda ser el responsable de la síntesis de FUM en *C. islandica*.

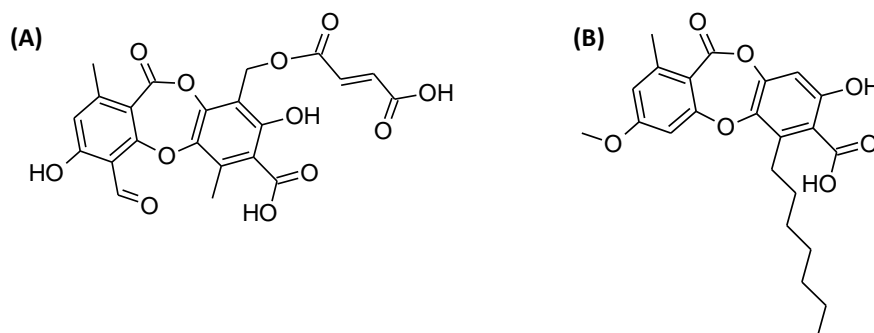


Figura 76. Estructuras químicas del ácido fumarprotocetrárico (A) y del ácido grayánico (B).

Con el fin de respaldar esta hipótesis, se lleva a cabo un análisis filogenético basado en la homología de secuencias KS. De forma muy interesante, el árbol filogenético obtenido muestra que una única secuencia KS se agrupa con alto nivel de consistencia (alta homología) con la secuencia de la PKS responsable de la síntesis de ácido grayánico en *Cladonia grayi*, y esa secuencia corresponde a la PKS anotada en el *scaffold* 270 del genoma de *Cetraria islandica*. En ese clado (Figura 77), también se observa una homología muy significativa con la secuencia KS de *Cladonia rangiferina*, especie líquénica en la que se ha descrito la síntesis del ácido fumarprotocetrárico como principal metabolito secundario (Nybakken y Julkunen-Tiitto,

2006; Kosanić y col., 2014); la homología de las secuencias sugiere una homología en la función de las enzimas. Estos datos nos ayudan a confirmar que la PKS del *scaffold* 270 es el candidato más probable para la síntesis de FUM en *C. islandica*.

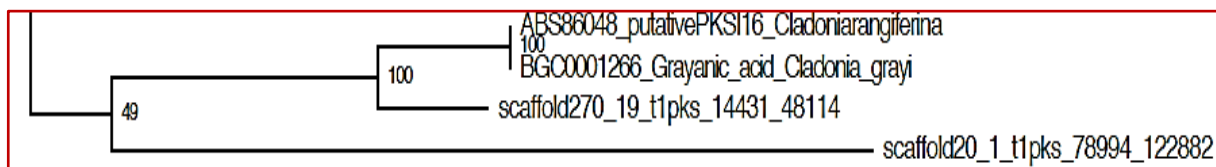


Figura 77. Clado de interés en que se agrupan con un alto nivel de consistencia la PKS tipo I de *Cetraria islandica* (*scaffold* 270) con la PKS identificada como responsable de la síntesis del ácido grayánico en *Cladonia grayi*. La inferencia filogenética que establece una estrecha relación entre estas dos secuencias sugiere una importante homología estructural.

Se observa que en ese clado se agrupa también, aunque con bajo nivel de consistencia, un *cluster* biosintético anotado en el *scaffold* número 20, que contiene una PKS tipo I. Para excluir otros candidatos, se analiza la organización en dominios de dicho *cluster*, y se observa que se trata de un gen PKS discontinuo, en que los dominios KS y AT han sido anotados en una única región del *cluster* y, por ello, se ha agrupado en el grupo de las PKS no reductoras tras el análisis filogenético. Sin embargo, en regiones muy cercanas se han anotado los dominios DH, ACP, TE y KR, por lo que se puede deducir que se trata de una PKS reductora, y por tanto, se excluye como posible gen candidato para la síntesis de FUM.

La similitud de las estructuras tipo depsidona de los ácidos grayánico y fumarprotocetárico, junto a la homología entre las secuencias KS de *C. grayi* y *C. rangiferina* (productoras, respectivamente, de dichos metabolitos), hacen suponer una alta probabilidad de la existencia de una ruta biosintética muy similar para ambos compuestos. Por tanto, podemos considerar como posible que la biosíntesis de FUM en *C. islandica* se realiza por una ruta semejante a la propuesta por Armaleo y colaboradores (2011) para el ácido grayánico en *C. grayi* (Figura 78). Cabe destacar que la estructura del gen PKS descrita en *C. grayi* (Figura 78) es prácticamente idéntica a la anotada en el *scaffold* 270 de *C. islandica* (Figura 73) en cuanto al número, tipo y orden de dominios, por lo que sería razonable una función similar de ambas enzimas.

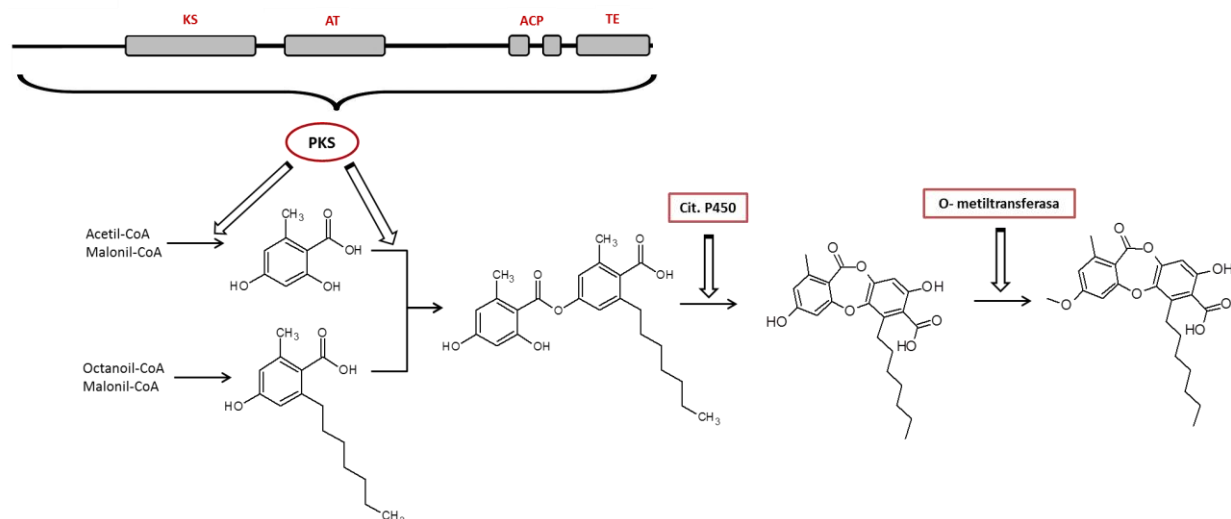


Figura 78. Ruta biosintética propuesta para el ácido grayánico en *C. grayi*, adaptada de Armaleo y col. (2011). Se representan también la arquitectura del gen PKS de *C. grayi* con sus distintos dominios.

Se propone, por tanto, que la enzima PKS identificada en el genoma de *C. islandica* generaría, mediante la actuación secuencial de sus dominios funcionales (KS, AT, ACP y TE), la estructura intermedia de depsida (Staunton y Weissman, 2001; Crawford y Townsend, 2010). La diferencia respecto a la ruta reflejada en la Figura 78 residiría en los sintones/precursores iniciales que, en lugar de contener la cadena hidrocarbonada propia del ácido grayánico, deberían incluir los sustituyentes laterales que presenta de forma específica el ácido fumarprotocetrárico,

Teniendo en cuenta los siguientes pasos de esta ruta biosintética y la acción del citocromo P-450 identificado en el *cluster* biosintético de *C. grayi* (Figura 78), se comprende la necesidad de la presencia de un gen codificante para citocromo P-450 en el *cluster* candidato de la síntesis de FUM (tal y como se demuestra en la Figura 73). El citocromo P-450 actuará como enzima adaptadora catalizando el acoplamiento oxidativo para la formación del tercer anillo y generará la estructura de depsidona de FUM (Isin y Guengerich, 2007). Además, la principal diferencia del *cluster* biosintético identificado en el genoma de *C. islandica* respecto del descrito en *C. grayi* radica en la ausencia de un gen codificante para una O-metiltransferasa (Figura 73). Si bien se entiende la función relevante que ejerce dicha enzima adaptadora en la biosíntesis del ácido grayánico, que consiste en la adición de un grupo metilo a un hidroxilo fenólico, se justifica razonadamente su ausencia en el *cluster* candidato para la síntesis de FUM, ya que éste no presenta ningún grupo  $-O-CH_3$ .

---

En resumen, tanto la predicción de la estructura del *cluster* biosintético, así como el análisis de la filogenia de dominios KS apuntan, por vías independientes, a que el *cluster* identificado en el *scaffold* 270 del genoma de *Cetraria islandica* es el más probable candidato para la síntesis de ácido fumarprotocetrárico en dicho líquen. A pesar de los resultados obtenidos, nuestros datos no pueden excluir categóricamente la posibilidad de que otra enzima PKS (codificada en un gen diferente) participe junto a la PKS del *cluster* candidato en la síntesis de FUM. La confirmación directa de que dicho *cluster* de genes es el responsable de la síntesis de FUM en *C. islandica* requiere de la expresión heteróloga de los genes en organismos de crecimiento rápido (p. ej., levaduras como *Saccharomyces* sp.) y la verificación de la síntesis del compuesto, ya que las técnicas para la transformación y la manipulación genética de los micobiontes líquénicos no están aún disponibles. En caso de resultados positivos, se obtendría una fuente de síntesis del ácido fumarprotocetrárico como un potencial agente neuroprotector, y se conseguiría solventar el problema del lento crecimiento de los líquenes en la naturaleza, que limita su uso para la extracción de compuestos activos.

# CONCLUSIONES

-----

El trabajo de Tesis Doctoral titulado “*Estudio con criterios filogenéticos del potencial neuroprotector de líquenes parmeliáceos. Mecanismo de acción de sus metabolitos secundarios*” se ha realizado con el objetivo de evaluar el potencial neuroprotector, basado en las propiedades antioxidantes, de cuatro metabolitos presentes en líquenes parmeliáceos (atranorina, ácido evérnico, ácido fumarprotocetrárico y ácido úsnico), así como de profundizar en su mecanismo de acción. Para ello, se ha utilizado un modelo de estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las líneas celulares SH-SY5Y (modelo neuronal) y U373-MG (modelo de astrogliá). Se ha iniciado el trabajo con el estudio del extracto metanólico de seis especies de la familia *Parmeliaceae* (*Cetraria islandica*, *Cetrelia braunsiana*, *Evernia prunastri*, *Parmotrema saccatilobum*, *Usnea ghattensis* y *Vulpicida canadensis*), sobre los que ha evaluado el potencial citoprotector y antioxidante. El análisis fitoquímico (por cromatografía líquida de alta eficacia) de los extractos ha permitido la identificación de los compuestos activos y su aislamiento, procediendo a la posterior evaluación de la actividad neuroprotectora y su mecanismo de acción.

En base a los resultados del trabajo experimental, pueden extraerse las siguientes conclusiones:

1) Se ha evaluado el **potencial citoprotector y antioxidante de los extractos metanólicos de seis especies de líquenes de la familia *Parmeliaceae*** (*Cetraria islandica*, *Cetrelia braunsiana*, *Evernia prunastri*, *Parmotrema saccatilobum*, *Usnea ghattensis* y *Vulpicida canadensis*).

a) Ejercen un significativo efecto citoprotector (en pre-tratamientos de 24 h) frente al daño oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, incrementando en un 11-21% la viabilidad en los dos modelos celulares utilizados. Ejercen mayor potencia citoprotectora en el modelo neuronal (línea SH-SY5Y), siendo las concentraciones que presentan un efecto óptimo (0,25-0,5 µg/ml) menores que las requeridas en el modelo de células gliales (línea U373-MG) (2,5-25 µg/ml).

b) El efecto citoprotector está mediado por una reducción del estrés oxidativo intracelular, tal y como se evidencia en una reducción de hasta el 30% en la generación intracelular de ERO, en la inhibición de la peroxidación lipídica (con reducción significativa de los niveles de MDA) y en el mantenimiento de un favorable ratio GSH/GSSG.

c) En los dos modelos celulares, los extractos que ejercen un efecto citoprotector más marcado son los de *E. prunastri* y *C. islandica*, que frente al efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, preservan los marcadores de EO en los valores más similares a los de células control. Además, ambos extractos son los que demuestran una mayor protección de la morfología celular normal.

d) Presentan un elevado contenido en compuestos fenólicos (35-162  $\mu\text{g}$  AG/mg extracto seco) que se correlaciona con una potente actividad de captación de radicales peroxilo. Así, el extracto de *E. prunastri*, con el mayor contenido en polifenoles, muestra el mayor valor ORAC (8,44  $\mu\text{mol TE/mg}$  muestra) como indicador de la potencia antioxidante.

2) El **estudio fitoquímico** de los extractos ha permitido identificar y aislar sus metabolitos activos. Así, se ha aislado la depsida ácido evérnico como compuesto mayoritario (constituye un 80-85%) del extracto de *E. prunastri*, y la depsidona ácido fumarprotocetrárico como principal metabolito del extracto de *C. islandica* (88-90% de su composición). La identidad y pureza de los compuestos aislados se ha confirmado por sus espectros de absorción UV y de  $^1\text{H}$ -RMN.

Además, se han seleccionado la depsida atranorina y el dibenzofurano ácido úsnico por haberse identificado en porcentajes variables en más de un extracto: atranorina se encuentra en los extractos de *C. braunsiana*, *E. prunastri* y *P. saccatilobum* (en contenido que varía del 6% al 21%), y el ácido úsnico está presente en los extractos de *U. ghattensis* y *V. canadensis* (entre el 37% y el 55%).

3) Se ha determinado, en base a las propiedades antioxidantes, el **potencial neuroprotector *in vitro* de los cuatro metabolitos secundarios aislados: atranorina, ácido evérnico, ácido fumarprotocetrárico y ácido úsnico**. El pre-tratamiento (24 h) de los modelos celulares de neurona y astrocito con dichos poliquétidos liquénicos ha demostrado un significativo efecto protector frente al daño oxidativo y la citotoxicidad mediada por  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Las concentraciones citoprotectoras óptimas se sitúan en el rango de 1-5  $\mu\text{g/ml}$  y de 2,5-25  $\mu\text{g/ml}$  para los modelos celulares SH-SY5Y y U373-MG, respectivamente, y aumentan la viabilidad celular (reflejada en la actividad enzimática mitocondrial) hasta en más del 20% en los casos de ácido evérnico y ácido fumarprotocetrárico.

Las actividades neuroprotectoras de los metabolitos liquénicos se reflejan en la protección de la morfología celular normal y están mediadas por las siguientes acciones:

a) Actividad captadora de radicales libres. Destaca sobremanera el elevado valor ORAC demostrado por el ácido evérnico (12,8  $\mu\text{mol TE/mg}$ ), y también el del ácido fumarprotocetrárico (5,1  $\mu\text{mol TE/mg}$ ).

b) Atenuación de las alteraciones de marcadores de estrés oxidativo debidas a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Inhibición de la generación intracelular de ERO debida a la acción del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , así como inhibición de la peroxidación lipídica y mantenimiento de mayores niveles del antioxidante



glutación. Los metabolitos ejercen efectos significativos en orden decreciente EVE > FUM > USN > ATR, y en intensidad similar en ambos modelos de neurona y astrocito.

c) Mayor expresión de enzimas antioxidantes. En los dos modelos celulares, el tratamiento con los compuestos liquénicos induce niveles proteicos significativamente elevados de las enzimas catalasa, superóxido dismutasas 1 y 2, glutación peroxidasa, glutación reductasa y hemooxigenasa-1. El mayor efecto se demuestra con los tratamientos con ácido evérnico y ácido fumarprotocetrárico, en ese orden, confiriendo un mayor potencial antioxidante a las células nerviosas.

d) Efecto protector a nivel mitocondrial. Los ácidos evérnico y fumarprotocetrárico previenen de la pérdida en el potencial de membrana mitocondrial y de la alteración de la homeostasis intracelular de iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Así, en los modelos celulares de neurona y astrocito, se encuentran niveles de PMM y concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial similares a los de células control.

e) Efecto antiapoptótico. Los compuestos liquénicos son capaces de inhibir la actividad y niveles de proteína activa de la enzima caspasa-3, y modulan la expresión de las proteínas reguladoras de la apoptosis BAX y Bcl-2, aumentando la primera y disminuyendo la segunda. Los efectos de los compuestos son evidentes, y en similar grado, en los dos modelos celulares, con un orden de actividad: EVE > FUM > USN > ATR.

f) Activación de la autofagia. En el modelo neuronal se demuestra, mediante la utilización de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  como inhibidor de fases tardías de la autofagia, que los ácidos evérnico y fumarprotocetrárico son capaces de inducir, en pre-tratamientos de 24 h y en presencia o ausencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , un mayor flujo autofágico de más del 150% respecto al presente en condiciones basales. Esto sugiere que ambos compuestos confieren a las células una mayor capacidad de reciclaje de mitocondrias disfuncionales y moléculas dañadas por EO.

4) Los efectos antioxidantes y citoprotectores de los compuestos liquénicos se deben, al menos en parte, a la **activación de la vía de señalización intracelular del factor Nrf2**, que regula la expresión génica de las enzimas citoprotectoras de fase-II.

En ambos modelos celulares, el tratamiento con los compuestos liquénicos demuestra un aumento significativo de la concentración nuclear del factor Nrf2 (hasta un 70% más respecto a células expuestas a  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) así como de su capacidad de unión al ADN (hasta un 60% más), que suponen los requisitos fundamentales para que este factor ejerza su acción reguladora de la transcripción génica. El ácido evérnico y el ácido fumarprotocetrárico, en ese orden, inducen la mayor activación de esta vía de señalización, que es superior a la presente en células control.

5) El estudio del potencial neuroprotector se ha completado estudiando la **capacidad de paso a través de la BHE** para los cuatro poliquétidos liquénicos. La predicción *in silico* de las propiedades moleculares de los compuestos, así como los ensayos *in vitro* de captación por células endoteliales (línea celular RBE4) y de permeabilidad a través de un modelo de BHE (línea celular hCMEC/D3), sugieren que el **ácido evérnico**, que presenta el mayor carácter lipófilo de los compuestos en estudio, es el compuesto con una mayor capacidad de paso a través de la BHE por mecanismo de difusión pasiva (vía transcelular); EVE muestra el mayor valor de permeabilidad aparente ( $3,05 \times 10^{-6}$  cm/s) a través del modelo celular hCMEC/D3.

6) En relación al **potencial de los metabolitos liquénicos como agentes anticancerígenos**, los resultados de los estudios de citotoxicidad sobre las líneas celulares HepG2 y MCF-7, derivadas de cánceres humanos de hígado y mama, respectivamente, sugieren que el **ácido úsnico** es, de entre los cuatro estudiados, el compuesto con mayor potencial anticancerígeno. El ácido úsnico exhibe los menores valores de  $CL_{50}$  (14,3 y 141,3  $\mu$ g/ml para células HepG2 y MCF-7), sugiriendo una marcada citotoxicidad frente a células cancerígenas, con especial actividad frente a carcinoma hepático.

7) El **estudio genómico del micobionte de *Cetraria islandica*** ha permitido anotar los principales *clusters* de genes biosintéticos presentes en su genoma. La predicción funcional de los genes PKS y el análisis filogenético de secuencias KS apuntan a un único *clusters* de genes como el candidato más probablemente responsable de la síntesis del ácido fumarprotocetrárico: un *cluster* anotado en el *scaffold* 270 del genoma que incluye un gen codificante para una enzima PKS tipo I no reductora y otro para citocromo P-450, lo que concuerda con los requerimientos funcionales para la síntesis de depsidonas.

A la vista de todos los resultados obtenidos, se puede concluir que se aporta una base científica sólida que respalda el interés del **ácido evérnico**, principalmente, y también del **ácido fumarprotocetrárico**, como compuestos activos con interés farmacológico como potenciales agentes neuroprotectores en situaciones de estrés oxidativo celular, como las que tienen lugar en el SNC durante el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas.

## CONCLUSIONS

-----

The current PhD thesis entitled “*Study with phylogenetic criteria of the neuroprotective potential of Parmeliaceae lichens. Mechanism of action of their secondary metabolites*” has been developed with the objective of evaluating the neuroprotective potential, based on antioxidant properties, of four active metabolites (atranorin, evernic acid, fumarprotocetraric acid and usnic acid) present in *Parmeliaceae* lichens and deepening in their mechanism of action. With these aims, we used a model of oxidative stress induced by  $H_2O_2$  in the cell lines SH-SY5Y (neuronal model) and U373-MG (model of glial cells). The work was initiated with the methanol extracts obtained from six lichen species belonging to *Parmeliaceae* family (*Cetraria islandica*, *Cetrelia braunsiana*, *Evernia prunastri*, *Parmotrema saccatilobum*, *Usnea ghattensis* and *Vulpicida canadensis*), on which we evaluated the antioxidant and cytoprotective capacities. The phytochemical analyses by high performance liquid chromatography allowed the identification of the major active compounds in the extracts, as well as their isolation and further investigation of their mechanism of neuroprotective action.

In view of the results from the experimental work, one could extract the following conclusions:

1) We have evaluated the **cytoprotective and antioxidant potential of the six methanol extracts obtained from *Parmeliaceae* lichens** (*Cetraria islandica*, *Cetrelia braunsiana*, *Evernia prunastri*, *Parmotrema saccatilobum*, *Usnea ghattensis* and *Vulpicida canadensis*).

a) They display a significant cytoprotective effect (in 24 h pre-treatments) against the oxidative damage induced by  $H_2O_2$ , thus increasing in 11-21% the viability in the two cell models employed. They exert a higher cytoprotective potency in the neuronal model (SH-SY5Y cell line), and the concentrations presenting the optimal effects (0.25-0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) are lower than those required in the model of glial cells (U373-MG cell line) (2.5-25  $\mu\text{g/ml}$ ).

b) The cytoprotective effect is mediated by a reduction in intracellular oxidative stress, as it is evidenced by a reduction up to 30% in the generation of intracellular ROS, the inhibition in lipid peroxidation (with a significant decrease in MDA levels) and the maintenance of a positive GSH/GSSG ratio.

c) In both cell models, the extracts showing the most remarkable cytoprotective effects against  $H_2O_2$  are those obtained from *E. prunastri* and *C. islandica* specimens, which maintain the oxidative stress markers in levels similar to those found in control cells. Besides, these two extracts demonstrate the highest preservation of normal cell morphology.

d) The extracts present a high content in phenolic compounds (35-162 µg AG/mg dry extract) which is correlated with a high peroxy radical scavenging activity. The extract from *E. prunastri*, with the highest content in polyphenols, shows the highest ORAC value (8.44 µg AG/mg dry extract) as an indicator of the antioxidant potency.

2) The **phytochemical analyses** of the extracts allowed the identification and isolation of the main active metabolites. Thus, the depside evernic acid has been isolated as the major compound (80-85% of its composition) of the *E. prunastri* extract and the depsidone fumarprotocetraric acid as the most abundant compound in *C. islandica* extract (88-90%). Their identity and purity was confirmed by the UV and <sup>1</sup>H-RMN spectroscopic data.

In addition, we selected the depside atranorin and the dibenzofuran usnic acid because of their identification in varying percentages in the composition of more than one extract: atranorin was found in the extracts from *C. braunsiana*, *E. prunastri* and *P. saccatilobum* (in a content between 6 and 21%), and usnic acid is present in the *U. ghattensis* and *V. canadensis* extracts (between 37 and 55%).

3) Based on the antioxidant properties, we have determined the ***in vitro* neuroprotective potential of the four isolated secondary metabolites: atranorin (ATR), evernic acid (EVE), fumarprotocetraric acid (FUM) and usnic acid (USN)**. The pre-treatment (24 h) of neuronal and astroglial cells with these lichen polyketides resulted in a significant protective effect against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated oxidative damage and cytotoxicity.

The optimal cytoprotective concentrations are in the ranges 1-5 µg/ml and 2.5-25 µg/ml for the cell models SH-SY5Y and U373-MG, respectively, and increase cell viability (as reflected in mitochondrial enzymatic activity) in more than 20% in the case of evernic and fumarprotocetraric acids.

The neuroprotective activities of lichen metabolites result in the preservation of normal cell morphology and are mediated by the following actions:

a) Free radical scavenging activity. One could highlight the high ORAC value corresponding to evernic acid (12.8 µmol TE/mg), and also that of fumarprotocetraric acid (5.1 µmol TE/mg).

b) Attenuation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced alterations in oxidative stress markers. Lichen metabolites inhibit the intracellular ROS generation, as well as inhibit the lipid peroxidation and maintain high levels of antioxidant glutathione (GSH). They exert significant effects in decreasing order EVE > FUM > USN > ATR, and in a similar degree in both models of neurons and astrocytes.

c) Enhanced expression of antioxidant enzymes. In the two cell models, treatments with lichen compounds induce significantly higher protein levels of the enzymes catalase, superoxide dismutases 1 and 2, glutathione peroxidase, glutathione reductase and hemeoxygenase-1. The highest effect is shown after cell treatments with evernic and fumarprotocetraric acids, in that order, thus affording higher antioxidant potential to nervous cells.

d) Mitochondria-targeted protective effects. Evernic acid and fumarprotocetraric acid prevent cells from the dissipation of mitochondrial membrane potential and from the alteration in intracellular calcium homeostasis. With this respect, in the cell models of neurons and astrocytes, we found levels of mitochondrial membrane potential and concentration of mitochondrial calcium which were similar to those in control cells.

e) Anti-apoptotic effect. Lichen compounds are capable to inhibit the activity and diminish active protein levels of the effector enzyme caspase-3, and to modulate the expression of apoptosis-regulating proteins such as BAX and Bcl-2 (increasing BAX and diminishing Bcl-2 levels). Such effects are found in a similar degree in the two cell models, with a decreasing potency order: EVE > FUM > USN > ATR.

f) Activation of autophagy process. In the model of neuronal cells, by employing an inhibitor of the late phases of autophagy ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), we showed that evernic and fumarprotocetraric acids enhance the autophagic flux in more than 150% in comparison to basal conditions (pre-treatment of 24h, in absence or present of  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). This finding suggests that both compounds confer higher capacity to recycle dysfunctional mitochondria and biomolecules damaged by oxidative stress.

4) The antioxidant and cytoprotective effects displayed by lichen compounds are mediated, at least in part, by the **activation of the Nrf2 transcription factor signaling pathway**, which regulates gene expression of phase-II cytoprotective enzymes.

In the two cell models, the treatments with lichen compounds demonstrate a significant increase in nuclear concentration of Nrf2 (up to 70% more compared to  $\text{H}_2\text{O}_2$ -treated cells), as well as in its DNA-binding capacity (up to 60% higher), which suppose the crucial requirements for this transcription factor to activate the gene transcription. Evernic acid and fumarprotocetraric acid, in that order, induce the highest activation of this signaling pathway, which is higher than that in control cells.

5) The study of the neuroprotective potential has been completed by assessing the **capacity of the four compounds to cross the blood brain barrier (BBB)**. The *in silico* prediction of their molecular properties as well as the *in vitro* assays measuring their uptake by endothelial cells (RBE4 cell line) and their permeability through a BBB model (hCMEC/D3 cell line) suggest that **evernic acid**, which presents the highest lipophylicity among the four compounds studied, is the one showing the highest capacity to permeate through BBB via passive diffusion (transcellular pathway); EVE presents the highest value of apparent permeability ( $3.05 \times 10^{-6}$  cm/s) accross the hCMEC/D3 cell model.

6) With respect to the **potential of lichen metabolites as anticancer agents**, our results from cytotoxicity studies on HepG2 and MCF-7 cell lines (which derive from liver and breast human cancers, respectively) suggest that **usnic acid** is the most active compound among the four studied. Usnic acid exhibits the lowest IC<sub>50</sub> values (14.3 and 141.3 µg/ml for HepG2 and MCF-7 cells, respectively), thus suggesting a remarkable cytotoxicity against cancer cells, with special potency against liver carcinoma.

7) The **genomic study on *Cetraria islandica* mycobiont** allowed the annotation of the main biosynthetic gene clusters in its genome. The functional prediction of PKS genes and the phylogenetic analysis of KS sequences point to only one gene cluster as the putative candidate which is most likely responsible for the synthesis of fumarprotocetraric acid: a cluster annotated in the scaffold 270 of the genome which includes a gene coding for a non reducing type I PKS and another gene coding for a cytochrome P-450; it meets the functional requirements for the synthesis of depsidones.

All in all, in a global view of all results, we conclude that this work provides solid scientific basis that uphold the interest of **evernic acid** (mainly) and also **fumarprotocetraric acid** as active compounds with pharmacological interest as potential neuroprotective agents in cellular oxidative stress situations, such as those occurring in the central nervous system during the development of neurodegenerative diseases.





## REFERENCES

- Abbott NJ, 2013. Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *Journal of Inherited Metabolic Diseases*, 36(3): 437-449.
- Abbott NJ, Dolman DE, Patabendige AK, 2008. Assays to predict drug permeation across the blood-brain barrier, and distribution to brain. *Current Drug Metabolism*, 9(9): 901-910.
- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ, 2010. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of Disease*, 37(1): 13-25.
- Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E, 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*, 7: 41-53.
- Abdel-Hameed M, Bertrand RL, Piercey-Normore MD, Sorensen JL, 2016. Putative identification of the usnic acid biosynthetic gene cluster by de novo whole-genome sequencing of a lichen-forming fungus. *Fungal Biology*, 120(3): 306-316.
- Abdou R, Scherlach K, Dahse HM, Sattler I, Hertweck C, 2010. Botryorhodines A-D, antifungal and cytotoxic depsidones from *Botryosphaeria rhodina*, an endophyte of the medicinal plant *Bidens pilosa*. *Phytochemistry*, 71: 110-116.
- Adamo A, Violante P, 2000. Weathering of rocks and neogenesis of minerals associated with lichen activity. *Applied Clay Science*, 16(5-6): 229-256.
- Ahmadjian V, 1993. *The Lichen Symbiosis*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Ahmed T, Raza SH, Maryam A, Setzer WN, Braidy N, Nabavi SF, de Oliveira MR, Nabavi SM, 2016. Ginsenoside Rb1 as a neuroprotective agent: A review. *Brain Research Bulletin*, 125: 30-43.
- Ajami M, Pazoki-Toroudi H, Amani H, Nabavi SF, Braidy N, Vacca RA, Atanasov AG, Mocan A, Nabavi SM, 2016. Therapeutic role of sirtuins in neurodegenerative disease and their modulation by polyphenols. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *in press*, doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.11.022.
- Albarracin SL, Stab B, Casas Z, Sutachan JJ, Samudio I, Gonzalez J, Gonzalo L, Capani F, Morales L, Barreto GE, 2012. Effects of natural antioxidants in neurodegenerative disease. *Nutritional Neuroscience*, 15(1): 1-9.
- Alov P, Tsakovska I, Pajeva I, 2015. Computational studies of free radical-scavenging properties of phenolic compounds. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 15(2): 85-104.
- Alpsoy L, Orhan F, Nardemir G, Agar G, Gulluce M, Aslan A, 2015. Antigenotoxic potencies of a lichen species, *Evernia prunastri*. *Toxicology and Industrial Health*, 31(2): 153-161.
- Alzheimer's Association, 2015. Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers and Dementia*, 11(3): 332-384.
- Amarowicz R, Pegg RB, Rahimi-Moghaddam P, Barl B, Weil JA, 2004. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plants species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84: 551-562.
- Andersen JK, 2004. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nature Medicine*, 10(Suppl): S18-25.
- Apak R, Güçlü K, Demirata B, Ozyürek M, Celik SE, Bektaşoğlu B, Berker KI, Ozyurt D, 2007. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12(7): 1496-1547.
- Aranda A, Sequedo L, Tolosa L, Quintas G, Burello E, Castell JV, Gombau L, 2013. Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: a quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells. *Toxicology In Vitro*, 27(2): 954-963.
- Araújo AA, de Melo MG, Rabelo TK, Nunes PS, Santos SL, Serafini MR, Santos MR, Quintans-Júnior LJ, Gelain DP, 2015. Review of the biological properties and toxicity of usnic acid. *Natural Products Research*, 29(23): 2167-2180.
- Arlt S, Müller-Thomsen T, Beisiegel U, Kontush A, 2012. Effect of one-year vitamin C- and E-supplementation on cerebrospinal fluid oxidation parameters and clinical course in Alzheimer's disease. *Neurochemical Research*, 37: 2706-2714.
- Armaleo D, 1995. Factors affecting depside and depsidone biosynthesis in a cultured lichen fungus. *Cryptogamic Botany*, 5: 14-21.
- Armaleo D, Sun X, Culbertson C, 2011. Insights from the first putative biosynthetic gene cluster for a lichen depside and depsidone. *Mycologia*, 103(4): 741-754.
- Armaleo D, Zhang Y, Cheung S, 2008. Light might regulate divergently depside and depsidone accumulation in the lichen *Parmotrema hypotropum* by affecting thallus temperature and water potential. *Mycologia*, 100: 565-576.
- Asahina Y, Shibata S, 1954. *Chemistry of lichen substances*. Japan, Society for the Promotion of Science, Tokyo.
- Asensi M, Sastre J, Pallardo FV, Lloret A, Lehner M, Garcia-de-la Asuncion J, Viña J, 1999. Ratio of reduced to oxidized glutathione as indicator of oxidative stress status and DNA damage. *Methods in Enzymology*, 299: 267-276.
- Asplund J, Wardle DA, 2016. How lichens impact on terrestrial community and ecosystem properties. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, *in press*, doi: 10.1111/bvr.12305.

- Atmani D, Ruiz-Larrea MB, Ruiz-Sanz JI, Lizcano LJ, Bakkali F, Atmani D, 2011. Antioxidant potential, cytotoxic activity and phenolic content of *Clematis flammula* leaf extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(4): 589-598.
- Avalos A, Vicente C, 1987. The occurrence of lichen phenolics in the photobiont cells of *Evernia prunastri*. *Plant Cell Reports*, 6(1): 74-76.
- Axelsen PH, Komatsu H, Murray IV, 2011. Oxidative stress and cell membranes in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Physiology (Bethesda)*, 26: 54-69.
- Baek SH, Noh AR, Kim KA, Akram M, Shin YJ, Kim ES, Yu SW, Majid A, Bae ON, 2014. Modulation of mitochondrial function and autophagy mediates carnosine neuroprotection against ischemic brain damage. *Stroke*, 45(8): 2438-2443.
- Bagchi D, Swaroop A, Preuss HG, Bagchi M, 2014. Free radical scavenging, antioxidant and cancer chemoprevention by grape seed proanthocyanidin: an overview. *Mutation Research*, 768: 69-73.
- Baghirov H, Karaman D, Viitala T, Duchanoy A, Lou YR, Mamaeva V, Pryazhnikov E, Khiroug L, de Lange Davies C, Sahlgren C, Rosenholm JM, 2016. Feasibility Study of the Permeability and Uptake of Mesoporous Silica Nanoparticles across the Blood-Brain Barrier. *PLoS One*, 11(8): e0160705.
- Bains JS, Shaw CA, 1997. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Research-Brain Research Reviews*, 25(3): 335-358.
- Bajić A, Spasić M, Andjus PR, Savić D, Parabucki A, , Nikolić-Kokić A, Spasojević I, 2013. Fluctuating vs. Continuous Exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: The Effects on Mitochondrial Membrane Potential, Intracellular Calcium, and NF-κB in Astroglia. *PLOS ONE*, 8(10): e76383.
- Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E, 2011. Alzheimer's disease. *Lancet*, 377(9770): 1019-1031.
- Balogun E, Hoque M, Gong P, Killeen E, Green CJ, Foresti R, Alam J, Motterlini R, 2003. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *The Biochemical Journal*, 371(Pt3): 887-895.
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA, 2012. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19(5): 455-477.
- Banks WA, 2009. Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier. *BMC Neurology*, 9(Suppl1): S3.
- Barres B, 2003. What is a glial cell? *Glia*. 43: 4-5.
- Bastianetto S, Ménard C, Quirion R, 2015. Neuroprotective action of resveratrol. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1852(6): 1195-1201.
- Baum L, Lam CW, Cheung SK, Kwok T, Lui V, Tsoh J, Lam L, Leung V, Hui E, Ng C, Woo J, Chiu HF, Goggins WB, Zee BC, Cheng KF, Fong CY, Wong A, Mok H, Chow MS, Ho PC, Ip SP, Ho CS, Yu XW, Lai CY, Chan MH, Szeto S, Chan IH, Mok V, 2008. Six-month randomized, placebo-controlled, double-blind, pilot clinical trial of curcumin in patients with Alzheimer disease. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 28: 110-113.
- Baxter PS, Hardingham GE, 2016. Adaptive regulation of the brain's antioxidant defences by neurons and astrocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, *in press*. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.027.
- Bayir Y, Odabasoglu F, Cakir A, Aslan A, Suleyman H, Halici M, Kazaz C, 2006. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. *Phytomedicine*, 13(8): 584-590.
- Baynes JW, 1991. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*, 40(4): 405-412.
- Bazinet RP, Layé S, 2014. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(12): 771-785.
- Beckman JS, Koppenol WH, 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *American Journal of Physiology*, 271: C1424-1437.
- Beckman KB, Ames BN, 1998. The free radical theory of ageing matures. *Physiological Reviews*, 78: 547-581.
- Beckmann DV, Carvalho FB, Mazzanti CM, Dos Santos RP, Andrades AO, Aiello G, Rippilinger A, Graça DL, Abdalla FH, Oliveira LS, Gutierrez JM, Schetinger MR, Mazzanti A, 2014. Neuroprotective role of quercetin in locomotor activities and cholinergic neurotransmission in rats experimentally demyelinated with ethidium bromide. *Life Sciences*, 103(2): 79-87.
- Behera BC, Makhija U, 2002. Inhibition of tyrosinase and xanthine oxidase by lichen species *Bulbothrix setschwanensis*. *Current Science*, 82: 61-66.
- Behera BC, Verma N, Sonone A, Makhija U, 2005. Evaluation of antioxidant potential of the cultured mycobiont of a lichen *Usnea ghattensis*. *Phytotherapy Research*, 2005, 19: 58-64.
- Behera BC, Verma N, Sonone A, Makhija U, 2009. Optimization of Culture Conditions for Lichen *Usnea ghattensis* G. Awasthi to Increase Biomass and Antioxidant Metabolite Production. *Food Technology and Biotechnology*, 47(1): 7-12.
- Bernacki J, Dobrowolska A, Nierwinska K, Malecki A, 2008. Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier. *Pharmacological Reports*, 60: 600-622.

- Beschel RE, 1961. Dating rock surfaces by lichen growth and its application to glaciology and physiography (lichenometry). In: Raasch GO, ed. *Geology of the Arctic*. vol. 2, Toronto, Canada: University of Toronto Press, pp. 1044–1062.
- Bhat AH, Dar KB, Anees S, Zargar MA, Masood A, Sofi MA, Ganie SA, 2015. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 74: 101-110.
- Bhupathiraju NV, Hu X, Zhou Z, Fronczek FR, Couraud PO, Romero IA, Weksler B, Vicente MG, 2014. Synthesis and *in vitro* evaluation of BBB permeability, tumor cell uptake, and cytotoxicity of a series of carboranylporphyrin conjugates. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(15): 6718-6728.
- Białońska D, Dayan FE, 2005. Chemistry of the lichen *Hypogymnia physodes* transplanted to an industrial region. *Journal of Chemical Ecology*, 31: 2975-2991.
- Bingle LEH, Simpson TJ, Lazarus CM, 1999. Ketosynthase domain probes identify two subclasses of fungal polyketide synthase genes. *Fungal Genetics and Biology*, 26: 209e223.
- Bocsik A, Darula Z, Tóth G, Deli MA, Wollemann M, 2015. Transfer of opiorphin through a blood-brain barrier culture model. *Archives of Medical Research*, 46(6): 502-506.
- Bodor N, Buchwald P, 2003. Brain-Targeted Drug Delivery: Experiences to Date. *American Journal of Drug Delivery*, 1: 13-26.
- Boetzer M, Henkel CV, Jansen HJ, Butler D, Pirovano W, 2011. Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE. *Bioinformatics*, 27(4): 578-579.
- Boetzer M, Pirovano W, 2012. Toward almost closed genomes with GapFiller. *Genome Biology*, 13(6): R56.
- Bogo D, de Matos MF, Honda NK, Pontes EC, Oguma PM, da Santos EC, de Carvalho JE, Nomizo A, 2010. *In vitro* antitumour activity of orsellinates. *Zeitschrift für Naturforschung C, Journal of Bioscience*, 65: 43-48.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B, 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, 30(15): 2114-2120.
- Bossy-Wetzel E, Petrilli A, Knott AB, 2008. Mutant huntingtin and mitochondrial dysfunction. *Trends in Neuroscience*, 31: 609-616.
- Boustie J, Grube M, 2005. Lichens -a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genetic Resources*, 3(2): 273-287.
- Bowie A, O'Neill LA, 2000. Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochemical Pharmacology*, 59(1): 13-23.
- Bradnam KR, Fass JN, Alexandrov A, Baranay P, Bechner M, y col., 2013. Assemblathon 2: evaluating de novo methods of genome assembly in three vertebrate species. *Gigascience*, 2(1): 10.
- Braidly N, Jugder BE, Poljak A, Jayasena T, Mansour H, Nabavi SM, Sachdev P, Grant R, 2016. Resveratrol as a Potential Therapeutic Candidate for the Treatment and Management of Alzheimer's Disease. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(17): 1951-1960.
- Bressenot A, Marchal S, Bezdetnaya L, Garrier J, Guillemin F, Plénat F, 2009. Assessment of apoptosis by immunohistochemistry to active caspase-3, active caspase-7, or cleaved PARP in monolayer cells and spheroid and subcutaneous xenografts of human carcinoma. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 57(4): 289-300.
- Brettschneider J, Del Tredici K, Lee VM, Trojanowski JQ, 2015. Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies. *Nature Reviews. Neuroscience*, 16(2): 109-120.
- Brewer MS, 2011. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(4): 221-247.
- Brglez-Mojzer E, Knez Hrnčič M, Škerget M, Knez Ž, Bren U, 2016. Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules*, 21(7): 901.
- Brisdelli F, Perilli M, Sellitri D, Piovano M, Garbarino JA, Nicoletti M, Bozzi A, Amicosante G, Celenza G, 2013. Cytotoxic activity and antioxidant capacity of purified lichen metabolites: an *in vitro* study. *Phytotherapy Research*, 27(3): 431-437.
- Brodo IM, Sharnoff SD, Sharnoff S, 2001. *Lichens of North America*. University Press New Haven and London.
- Brown AM, Ransom BR, 2007. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia*, 55: 1263-1671.
- Browne SE, Ferrante RJ, Beal MF, 1999. Oxidative stress in Huntington's disease. *Brain Pathology*, 9(1): 147-163.
- Brunauer G, Hager A, Grube M, Türk R, Stocker-Wörgötter E, 2007. Alterations in secondary metabolism of aposymbiotically grown mycobionts of *Xanthoria elegans* and cultured resynthesis stages. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45: 146-151.
- Bryan HK, Olayanju A, Goldring CE, Park BK, 2013. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochemical Pharmacology*, 85(6): 705-717.
- Bucar F, Schneider I, Ogmundsdóttir H, Ingólfssdóttir K, 2004. Anti-proliferative lichen compounds with inhibitory activity on 12(S)-HETE production in human platelets. *Phytomedicine*, 11: 602-606.
- Buchfink B, Xie C, Huson DH, 2015. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature Methods*, 12(1): 59-60.
- Buendia I, Michalska P, Navarro E, Gameiro I, Egea J, León R, 2016. Nrf2-ARE pathway: An emerging target against oxidative stress and neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Pharmacology and Therapeutics*, 157: 84-104.

- Bulut M, Selek S, Bez Y, Cemal Kaya M, Gunes M, Karababa F, Celik H, Savas HA, 2013. Lipid peroxidation markers in adult attention deficit hyperactivity disorder: new findings for oxidative stress. *Psychiatry Research*, 209(3): 638-642.
- Burkholder PR, Evans AW, McVeigh I, Thornton HK, 1944. Antibiotic Activity of Lichens. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the United States of America*, 30(9): 250-255.
- Burkin AA, Kononenko GP, 2014. Secondary fungal metabolites (mycotoxins) in 1044 lichens of different taxonomic groups. *The Biological Bulletin*, 41: 216-222.
- Burlando B, Ranzato E, Volante A, Appendino G, Pollastro F, Verotta L, 2009. Antiproliferative effects on tumour cells and promotion of keratinocyte wound healing by different lichen compounds. *Planta Medica*, 75: 607-613.
- Burté F, Carelli V, Chinnery PF, Yu-Wai-Man P, 2015. Disturbed mitochondrial dynamics and neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neurology*, 11(1): 11-24.
- Bush DS, Jones RL, 1987. Measurement of cytoplasmic calcium in aleurone protoplasts using indo-1 and fura-2. *Cell Calcium*, 8(6): 455-472.
- Byun YJ, Kim SK, Kim YM, Chae GT, Jeong SW, Lee SB, 2009. Hydrogen peroxide induces autophagic cell death in C6 glioma cells via BNIP3-mediated suppression of the mTOR pathway. *Neuroscience Letters*, 461(2): 131-135.
- Calabrese V, Guagliano E, Sapienza M, Panebianco M, Calafato S, Puleo E, Pennisi G, Mancuso C, Butterfield DA, Stella AG, 2007. Redox regulation of cellular stress response in aging and neurodegenerative disorders: role of vitagenes. *Neurochemical Research*, 32(4-5): 757-773.
- Calkins MJ, Jakel RJ, Johnson DA, Chan K, Kan YW, Johnson JA, 2005. Protection from mitochondrial complex II inhibition in vitro and in vivo by Nrf2-mediated transcription. *Proceeding of the Natural Academy of Sciences USA*, 102: 244-249.
- Cao G, Alessio HM, Cutler RG, 1993. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 14: 303-311.
- Cao G, Prior RL, 1999. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. *Methods in Enzymology*, 299: 50-62.
- Cardinale M, Puglia AM, Grube M, 2006. Molecular analysis of lichen-associated bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 57: 484-495.
- Carpenter TS, Kirshner DA, Lau EY, Wong SE, Nilmeier JP, Lightstone FC, 2014. A method to predict blood-brain barrier permeability of drug-like compounds using molecular dynamics simulations. *Biophysical Journal*, 107(3): 630-641.
- Carrizzo A, Forte M, Damato A, Trimarco V, Salzano F, Bartolo M, Maciag A, Puca AA, Vecchione C, 2013. Antioxidant effects of resveratrol in cardiovascular, cerebral and metabolic diseases. *Food and Chemical Toxicology*, 61: 215-226.
- Casas-Grajales S, Muriel P, 2015. Antioxidants in liver health. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, 6(3): 59-72.
- Celsi F, Pizzo P, Brini M, Leo S, Fotino C, Pinton P, Rizzuto R, 2009. Mitochondria, calcium and cell death: a deadly triad in neurodegeneration. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1787(5): 335-344.
- Cernava T, Berg G, Grube M, 2016. High Life Expectancy of Bacteria on Lichens. *Microbial Ecology*, 72(3): 510-513.
- Cernescu I, Tartaş L, Macavei A, Lupusoru CE, 2011. Experimental research on the effects of a *Cetraria islandica* extract on oxidative stress in laboratory animals. *Revista medico-chirurgicală a Societăţii de Medici şi Naturalişti din Iaşi*, 115: 899-904.
- Chakravarthi S, Jessop CE, Bulleid NJ, 2006. The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress. *EMBO Reports*, 7(3): 271-275.
- Chakravarti B, Chakravarti DN, 2007. Oxidative modification of proteins: age-related changes. *Gerontology*, 53(3): 128-139.
- Chaudière J, Ferrari-Iliou R, 1999. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, 37(9-10): 949-962.
- Chen S, Zhang Z, Qing T, Ren Z, Yu D, Couch L, Ning B, Mei N, Shi L, Tolleson WH, Guo L, 2016. Activation of the Nrf2 signaling pathway in usnic acid-induced toxicity in HepG2 cells. *Archives of Toxicology*, *in press*, doi: 10.1007/s00204-016-1775-y.
- Chen Y, Vartiainen NE, Ying W, Chan PH, Koistinaho J, Swanson RA, 2001. Astrocytes protect neurons from nitric oxide toxicity by a glutathione-dependent mechanism. *Journal of Neurochemistry*, 77(6): 1601-1610.
- Chen Z, Zhong C, 2014. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neuroscience Bulletin*, 30(2): 271-281.
- Chong SJ, Low IC, Pervaiz S, 2014. Mitochondrial ROS and involvement of Bcl-2 as a mitochondrial ROS regulator. *Mitochondrion*, 19 (PtA): 39-48.
- Cocchietto M, Skert N, Nimis P, Sava G, 2002. A review on usnic acid, an interesting natural compound. *Naturwissenschaften*, 89(4): 137-146.
- Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M, 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21(18): 3674-3646.
- Conti ME, Cecchetti G, 2001. Biological monitoring: lichens as bioindicators of air pollution assessment--a review. *Environmental Pollution*, 114(3): 471-492.

- Contreras L, Drago I, Zampese E, Pozzan T, 2010. Mitochondria: the calcium connection. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1797(6-7): 607-618.
- Cook WE, Raisbeck MF, Cornish TE, Williams ES, Brown B, Hiatt G, Kreeger T J, 2007. Paresis and death in elk (*Cervus elaphus*) due to lichen intoxication in Wyoming. *Journal of Wildlife Diseases*, 43: 498-503.
- Correia SC, Santos RX, Cardoso SM, Santos MS, Oliveira CR, Moreira PI, 2012. Cyanide preconditioning protects brain endothelial and NT2 neuron-like cells against glucotoxicity: Role of mitochondrial reactive oxygen species and HIF-1 $\alpha$ . *Neurobiology of Disease*, 45: 206-218.
- Couto N, Wood J, Barber J, 2016. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radical Biology and Medicine*, 95: 27-42.
- Crawford JM, Townsend CA, 2010. New insights into the formation of fungal aromatic polyketides. *Nature Reviews Microbiology*, 8(12): 879-889.
- Crawford SD, 2007. Ethnolichenology of *Bryoria fremontii*: wisdom of elders, population ecology, and nutritional chemistry. M.Sc. thesis, University of Victoria, Canada.
- Crawford SD, 2015. Lichens Used in Traditional Medicine. Chapter 2. In: Rankovic B (ed.) *Lichen Secondary Metabolites*, Springer International Publishing Switzerland.
- Crespo A, Blanco O, Hawksworth DL, 2001. The potential of the mitochondrial DNA gene for establishing phylogeny and stabilizing generic concepts in the parmelioid lichens. *Taxon*, 50: 807-819.
- Crespo A, Kauff F, Divakar PK, del Prado R, Perez-Ortega S, de Paz GA, Ferencova Z, Blanco O, Roca-Valiente B, Nunez-Zapata J, Cubas P, Arguello A, Elix JA, Esslinger TL, Hawksworth DL, Millanes A, Molina MC, Wedin M, Ahti T, Aptroot A, Barreno E, Bungartz F, Calvelo S, Candan M, Cole M, Ertz D, Goffinet B, Lindblom L, Lucking R, Lutzoni F, Mattsson J-E, Messuti MI, Miadlikowska J, Piercey-Normore M, Rico V.J., Sipman HJM, Schmitt I, Spribille T, Thell A, Thor G, Upreti DK, Lumbsch HT, 2010b. Phylogenetic generic classification of parmelioid lichens (*Parmeliaceae*, Ascomycota) based on molecular, morphological and chemical evidence. *Taxon*, 59: 1735-1753.
- Crespo A, Lumbsch HT, 2010a. Cryptic species in lichen-forming fungi. *IMA Fungus*, 1: 167-170.
- Crespo A, Lumbsch HT, Mattsson JE, Blanco O, Divakar PK, Articus K, Wiklund E, Bawingan PA, Wedin M, 2007. Testing morphology-based hypotheses of phylogenetic relationships in *Parmeliaceae* (Ascomycota) using three ribosomal markers and the nuclear rpb1 gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44: 812-824.
- Crespo A, Pérez-Ortega S, 2009. Cryptic species and species pairs in lichens: a discussion on the relationship between molecular phylogenies and morphological characters. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 66S1: 71-81.
- Cubero O, Crespo A, 2002. Isolation of nucleic acids from lichens. In: *Protocols in Lichenology. Culturing, Biochemistry, Ecophysiology and Use in Biomonitoring*. (Eds) Kranner IC, Beckett RP, Varma AK. Springer Berlin Heidelberg.
- Cuervo AM, Bergamini E, Brunk UT, Dröge W, French M, Terman A, 2005. Autophagy and aging: the importance of maintaining "clean" cells. *Autophagy*, 1(3): 131-140.
- Czeisler BM, Janigro D, 2006. Reading and writing the blood-brain barrier: relevance to therapeutics. *Recent Patents on CNS Drug Discovery*, 1(2): 157-173.
- D'Autreaux B, Toledano MB, 2007. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8: 813-824.
- Dajas F, Abin-Carriquiry JA, Arredondo F, Blasina F, Echeverry C, Martínez M, Rivera F, Vaamonde L, 2015. Quercetin in brain diseases: Potential and limits. *Neurochemistry International*, 89: 140-148.
- D'Amelio M, Cavallucci V, Cecconi F, 2010. Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death and Differentiation*, 17(7): 1104-1114.
- Dan Dunn J, Alvarez LA, Zhang X, Soldati T, 2015. Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biology*, 6: 472-485.
- Danta CC, Piplani P, 2014. The discovery and development of new potential antioxidant agents for the treatment of neurodegenerative diseases. *Expert Opinion in Drug Discovery*, 9(10): 1205-1222.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D, 2011. ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*, 27(8): 1164-1165.
- Das S, Deb B, 2015. DNA barcoding of fungi using Ribosomal ITS Marker for genetic diversity analysis: A Review. *International Journal of Pure and Applied Bioscience*, 3(3): 160-167.
- Dávalos A, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B, 2004. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-Fluorescein) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 48-54.
- Dayan FE, Romagni JG, 2001. Lichens as a potential source of pesticides. *Pestic Outlook*, 12: 229-232.
- Dayan FE, Romagni JG, 2002. Structural diversity of lichen metabolites and their potential for use. In: Upadhyaya R (ed). *Advances in microbial toxin research and its biotechnological Exploration*. Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, p. 151.
- De Barros Alves GM, de Sousa Maia MB, de Souza Franco E, Galvão AM, da Silva TG, Gomes RM, Martins MB, da Silva Falcão EP, de Castro CM, da Silva NH, 2014. Expectorant and antioxidant activities of purified fumarprotocetraric acid from *Cladonia verticillaris* lichen in mice. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, 27(2): 139-143.

- de Boer AG, Gaillard PJ, 2007. Drug targeting to the brain. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47: 323-355.
- de Oliveira MR, Nabavi SF, Manayi A, Daglia M, Hajheydari Z, Nabavi SM, 2016. Resveratrol and the mitochondria: From triggering the intrinsic apoptotic pathway to inducing mitochondrial biogenesis, a mechanistic view. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1860(4): 727-745.
- De Paz G, Cubas P, Divakar PK, Lumbsch HT, Crespo A, 2011. Origin and diversification of major clades in parmelioid lichens (Parmeliaceae, Ascomycota) during the Paleogene inferred by Bayesian analysis, *PLoS One*, 6: e28161.
- De Paz G, Lumbsch HT, Cubas P, Elix JA, Crespo A, 2010a. The morphologically deviating genera *Omphalodiella* and *Placoparmelia* belong to *Xanthoparmelia* (Parmeliaceae). *Bryologist*, 113: 376-386.
- De Paz G, Raggio J, Gómez-Serranillos MP, Palomino OM, González-Burgos E, Carretero ME, Crespo A, 2010b. HPLC isolation of antioxidant constituents from *Xanthoparmelia* spp. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53(2): 165-171.
- Deng YN, Shi J, Liu J, Qu QM, 2013. Celastrol protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells from rotenone-induced injury through induction of autophagy. *Neurochemistry International*, 63(1): 1-9.
- Deniaud A, Sharaf el dein O, Maillier E, Poncet D, Kroemer G, Lemaire C, Brenner C, 2008. Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Oncogene*, 27: 285-299.
- Deshane J, Wright M, Agarwal A, 2005. Heme oxygenase-1 expression in disease states. *Acta Biochimica Polonica*, 52: 273-284.
- Desnuelle C, Dib M, Garrel C, Favier A, 2001. A double-blind, placebo-controlled randomized clinical trial of  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E) in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and other Motor Neuron Disorders*, 2: 9-18.
- Detmer SA, Chan DC, 2007. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8: 870-879.
- Devbhuti P, Saha A, Sengupta C, 2009. Gentamicin induced lipid peroxidation and its control with ascorbic acid. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 66(4): 363-369.
- Di L, Kerns EH, 2015. *Blood-Brain Barrier in Drug Discovery: Optimizing Brain Exposure of CNS Drugs and Minimizing Brain Side Effects for Peripheral Drugs*. (Ed.) John Wiley and Sons, Inc., EEUU.
- Díaz-Hung ML, González Fraguola ME, 2014. Oxidative stress in neurological diseases: cause or effect? *Neurologia*, 29(8): 451-452.
- Dickinson DA, Forman HJ, 2002. Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 973: 488-504.
- Divakar PK, Crespo A, Blanco O, Lumbsch HT, 2006. Phylogenetic significance of morphological characters in the tropical *Hypotrachyna* clade of parmelioid lichens (Parmeliaceae, Ascomycota). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40: 448-458.
- Divakar PK, Del-Prado R, Lumbsch HT, Wedin M, Esslinger TL, Leavitt SD, 2012. Diversification of the newly recognized lichen-forming fungal lineage *Montanelia* (Parmeliaceae, Ascomycota) and its relation to key geological and climatic events, *American Journal of Botany*, 99: 2014-2026.
- Donato AJ, Morgan RG, Walker AE, Lesniewski LA, 2015. Cellular and molecular biology of aging endothelial cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2015; 89(Pt B): 122-135.
- Dorado-Martínez C, Rugerio C, Selva A, 2003. Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 46(6): 229-235.
- Dorsey ER, George BP, Leff B, Willis AW, 2013. The coming crisis: obtaining care for the growing burden of neurodegenerative conditions. *Neurology*, 80(21): 1989-1996.
- Dragicevic N, Smith A, Lin X, Yuan F, Copes N, Delic V, Tan J, Cao C, Shytle RD, Bradshaw PC, 2011. Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and other flavonoids reduce Alzheimer's amyloid-induced mitochondrial dysfunction. *Journal of Alzheimer's Disease*, 26: 507-521.
- Dringen R, 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology*, 62(6): 649-671.
- Dringen R, Pfeiffer B, Hamprecht B, 1999. Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. *Journal of Neuroscience*, 19: 562-569.
- Duchen MR, 2012. Mitochondria, calcium-dependent neuronal death and neurodegenerative disease. *Pflugers Archive: European Journal of Physiology*, 464: 111-121.
- East DA, Campanella M, 2016. Mitophagy and the therapeutic clearance of damaged mitochondria for neuroprotection. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 79: 382-387.
- Ebrahimi A, Schluesener H, 2012. Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: Potentials and pitfalls. *Ageing Research Reviews*, 11: 329-345.
- Einarsdóttir E, Groeneweg J, Björnsdóttir GG, Harethardóttir G, Omarsdóttir S, Ingólfssdóttir K, Ogmundsdóttir HM, 2010. Cellular mechanisms of the anticancer effects of the lichen compound usnic acid. *Planta Medica*, 76: 969-974.
- Elix JA, 1996. *Lichen Biology*, ed. T. H. Nash, III, Cambridge University Press, pp. 154-180.

- Elix JA, Wardlaw JH, 2000. Lusitanic acid, persististic acid and verrucigeric acid. Three new b-orcinol depsidones from the lichen *Relicina sydneyensis* and *Xanthoparmelia verrucigera*. Australian Journal of Chemistry, 53: 815-818.
- Ellis CJ, 2012. Lichen epiphyte diversity: A species, community and trait-based review. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics, 14(2): 131-152.
- Elmore S, 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicologic Pathology, 35: 495-516.
- Engel K, Schmidt U, Reuter J, Weckesser S, Simon-Haarhaus B, Schempp CM, 2007. Usnea barbata extract prevents ultraviolet-B induced prostaglandin E2 synthesis and COX-2 expression in HaCaT keratinocytes. Journal of Photochemistry and Photobiology B, 89: 9-14.
- Erecińska M, Silver IA, 2001. Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. Respiration Physiology, 128(3): 263-276.
- Eriksson OE, Hawksworth DL, 1998. Outline of the ascomycetes. Systema Ascomycetum, 16: 83-301.
- Ernst L, Forsmark-Andrée P, 1993. Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organisms. The Clinical Investigator, 71(8 Suppl): S60-65.
- Ernst-Russell MA, Elix JA, Chai CLL, Hockless DRC, Hurne AM, Waring P, 1999. Structure Revision and Cytotoxic Activity of the Scabrosin Esters, Epidithiopiperazinediones from the Lichen *Xanthoparmelia scabrosa*. Australian Journal of Chemistry, 52(4): 279-283.
- Ertl L, 1951. Über die Lichtverhältnisse in Laubfl. echten. Planta, 39: 245-270.
- Ertl P, Rohde B, Selzer P, 2000. Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. Journal of Medicinal Chemistry, 43: 3714-3717.
- Eschweiler FG, 1824. Systema lichenum, genera exhibens rite distincta, pluribus novis adaucta. Norimbergae.
- European Pharmacopeia, 2005. Iceland moss-Lichen islandicus. European Pharmacopeia, 5th ed. (Vol. 5.0). Strasbourg: Council of Europe.
- Fadel O, El Kirat K, Morandat S, 2011. The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation *in situ*. Biochimica et Biophysica Acta, 1808(12): 2973-2980.
- Fang F, Chen XC, Zhu YG, Zhou YC, 2003. Ginsenoside Rg1 may protect SHSY5Y cells from apoptosis induced by MPP+ through JNK way. Yao Xue Xue Bao, 38(3): 176-180.
- Federico A, Cardaioli E, Da Pozzo P, Formichi P, Gallus GN, Radi E, 2012. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. Journal of the neurological sciences, 322(1-2): 254-262.
- Fellin T, Pascual O, Gobbo S, Pozzan T, Haydon PG, Carmignoto G, 2004 Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. Neuron, 43:729-743.
- Fernández-Moriano C, Divakar PK, Crespo A, Gómez-Serranillos MP. 2015a. Neuroprotective activity and cytotoxic potential of two *Parmeliaceae* lichens: identification of their active compounds. Phytomedicine, 22: 847-855.
- Fernández-Moriano C, Divakar PK, Crespo A, Gómez-Serranillos MP. 2015b. Antioxidant and cytoprotective potentials of *Parmeliaceae* lichens and identification of active compounds. Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia, 81(2): 164-178.
- Fernández-Moriano C, Gómez-Serranillos MP, Crespo A, 2016. Antioxidant potential of lichen species and their secondary metabolites. A systematic review. Pharmaceutical Biology, 54(1): 1-17.
- Fernández-Moriano C, González-Burgos E, Gómez-Serranillos MP, 2015c. Mitochondria-Targeted Protective Compounds in Parkinson's and Alzheimer's Diseases. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2015: 408927.
- Ferretta A, Gaballo A, Tanzarella P, Piccoli C, Capitanio N, Nico B, Annese T, Di Paola M, Dell'aquila C, De Mari M, Ferranini E, Bonifati V, Pacelli C, Cocco T, 2014. Effect of resveratrol on mitochondrial function: implications in parkin-associated familial Parkinson's disease. Biochimica et Biophysica Acta, 1842(7): 902-915.
- Feuerer T, Hawksworth DL, 2007. Biodiversity of lichens, including a worldwide analysis of checklist data based on Takhtajan's floristic regions. Biodiversity and Conservation, 16: 85-98.
- Filipský T, Říha M, Macáková K, Anzenbacherová E, Karlíčková J, Mladěnka P, 2015. Antioxidant effects of coumarins include direct radical scavenging, metal chelation and inhibition of ROS-producing enzymes. Current Topics in Medicinal Chemistry, 15(5): 415-431.
- Filomeni G, Graziani I, De Zio D, Dini L, Centonze D, Rotilio G, Ciriolo MR, 2012. Neuroprotection of kaempferol by autophagy in models of rotenone mediated acute toxicity: possible implications for Parkinson's disease. Neurobiology of Aging, 33(4): 767-785.
- Firdaus WJ, Wyttenbach A, Diaz-Latoud C, Currie RW, Arrigo AP, 2006. Analysis of oxidative events induced by expanded polyglutamine huntingtin exon 1 that are differentially restored by expression of heat shock proteins or treatment with an antioxidant. The FEBS Journal, 273(13): 3076-3093.
- Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A, 2013. Farmacología humana. 6ª edición. (Ed.) Elsevier-Masson, Madrid, España.
- Floyd RA, Hensley K, 2002. Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. Neurobiology of Aging, 23(5): 795-807.

- Folch J, Ettcheto M, Petrov D, Abad S, Pedrós S, Marin M, Olloquequi J, Camins A, 2015. Una revisión de los avances en la terapéutica de la enfermedad de Alzheimer: estrategia frente a la proteína  $\beta$ -amiloide. *Neurología. In press*. Doi: 10.1016/j.nrl.2015.03.012.
- Fotakis G, Timbrell JA, 2006. *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160(2): 171-177.
- Freysdóttir J, Omarsdóttir S, Ingólfssdóttir, Víkingsson A, Olafsdóttir ES, 2008. *In vitro* and *in vivo* immunomodulating effects of traditionally prepared extract and purified compounds from *Cetraria islandica*. *International Immunopharmacology*, 8: 423-430.
- Fridovich I, 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Reviews of Biochemistry*, 64: 97-112.
- Friedland-Leuner K, Stockburger C, Denzer I, Eckert GP, Müller WE, 2014. Mitochondrial dysfunction: cause and consequence of Alzheimer's disease. *Progress in Molecular Biology and Translational Sciences*, 127: 183-210.
- Frisvad JC, Andersen B, Thrane U, 2008. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *Mycological Research*, 112(Pt 2): 231-240.
- Fujita K, Yamafuji M, Nakabeppu Y, Noda M, 2012. Therapeutic approach to neurodegenerative diseases by medical gases: focusing on redox signaling and related antioxidant enzymes. *Oxidative Medicine and Cell Longevity*, 2012: 324256.
- Gabathuler R, 2010. Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases. *Neurobiology of Disease*, 37: 48-57.
- Gackowski D, Rozalski R, Siomek A, Dziaman T, Nicpon K, Klimarczyk M, Araszkiewicz A, Olinski R, 2007. Oxidative stress and oxidative DNA damage is characteristic for mixed Alzheimer disease/vascular dementia. *Journal of the Neurological Sciences*, 266(1-2): 57-62.
- Galasko DR, Peskind E, Clark CM, Quinn JF, Ringman JM, Jicha GA, Cotman C, Cottrell B, Montine TJ, Thomas RG, Aisen P, 2012. Antioxidants for Alzheimer disease: a randomized clinical trial with cerebrospinal fluid biomarker measures. *Archives of Neurology*, 69: 836-841.
- Galluzzi L, Blomgren K, Kroemer G, 2009. Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. *Nature Reviews Neuroscience*, 10: 481-494.
- Gao Y, Yang Z, Li X, 2016. Regeneration strategies after the adult mammalian central nervous system injury-biomaterials. *Regenerative Biomaterials*, 3(2): 115-122.
- Gao Z, Huang K, Xu H, 2001. Protective effects of flavonoids in the roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HS-SY5Y cells. *Pharmacological Research*, 43(2): 173-178.
- Gargas A, DePriest PT, Grube M, Tehler A, 1995. Multiple origins of lichen symbioses in fungi suggested by SSU rDNA phylogeny. *Science*, 268(5216): 1492-1495.
- Garzón GA, Manns DC, Riedl K, Schwartz SJ, Padilla-Zakour O, 2015. Identification of phenolic compounds in petals of nasturtium flowers (*Tropaeolum majus*) by high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry and determination of oxygen radical absorbance capacity (ORAC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(6): 1803-1811.
- Gee JR, Keller JN, 2005. Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37(6): 1145-1150.
- Ghavami S, Shojaei S, Yeganeh B, Ande SR, Jangamreddy JR, Mehrpour M, Christoffersson J, Chaabane W, Moghadam AR, Kashani HH, Hashemi M, Owji AA, Łos MJ, 2014. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Progress in Neurobiology*, 112: 24-49.
- Giacoppo S, Galuppo M, Montaut S, Iori R, Rollin P, Bramanti P, Mazzon E, 2015. An overview on neuroprotective effects of isothiocyanates for the treatment of neurodegenerative diseases. *Fitoterapia*, 106: 12-21.
- Gilbert DL, Colton CA, 1999. *Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach*. Kluwer Academic/Plenum Publishers. Nueva York, USA.
- Giordano S, Darley-Usmar V, Zhang J, 2013. Autophagy as an essential cellular antioxidant pathway in neurodegenerative disease. *Redox Biology*, 2: 82-90.
- Giorgi C, Agnoletto C, Bononi A, Bonora M, De Marchi E, Marchi S, Missiroli S, Patergnani S, Poletti F, Rimessi A, Suski JM, Wieckowski MR, Pinton P, 2012. Mitochondrial calcium homeostasis as potential target for mitochondrial medicine. *Mitochondrion*, 12(1): 77-85.
- Glantzounis GK, Tsimoyiannis EC, Kappas AM, Galaris DA, 2005. Uric acid and oxidative stress. *Current Pharmaceutical Design*, 11(32): 4145-4151.
- Gomes AT, Honda NK, Roese FM, Muzzi RM, Sauer L, 2006. Cytotoxic activity of orsellinates. *Zeitschrift für Naturforschung C, Journal of Bioscience*, 61: 653-657.
- Gomes CM, Santos R, 2013. Neurodegeneration in Friedreich's ataxia: from defective frataxin to oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013: 487534.
- Gómez-Serranillos MP, Fernández-Moriano C, González-Burgos E, Divakar PK, Crespo A, 2014. Parmeliaceae family: phytochemistry, pharmacological potential and phylogenetic features. *RSC Advances*, 4: 59017-59047.
- González-Burgos E, 2012. Estudio de la actividad neuroprotectora de diterpenos aislados del género *Sideritis*. Tesis Doctoral.
- González-Burgos E, Carretero ME, Gómez-Serranillos MP, 2012. Diterpenoids isolated from *Sideritis* species protect astrocytes against oxidative stress via Nrf2. *Journal of Natural Products*, 75(10): 1750-1758.



- González-Burgos E, Carretero ME, Gómez-Serranillos MP, 2013a. *In vitro* permeability study of CNS-active diterpenes from *Sideritis* spp. using cellular models of blood-brain barrier. *Planta Medica*, 79(16): 1545-1551.
- González-Burgos E, Carretero ME, Gómez-Serranillos MP, 2013c. Nrf2-dependent neuroprotective activity of diterpenoids isolated from *Sideritis* spp. *Journal of Ethnopharmacology*, 147(3): 645-652.
- González-Burgos E, Duarte AI, Carretero ME, Moreira PI, Gómez-Serranillos MP, 2013b. Mitochondrial-targeted protective properties of isolated diterpenoids from *Sideritis* spp. in response to the deleterious changes induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Journal of Natural Products*, 76(5): 933-938.
- González-Burgos E, Fernández-Moriano C, Gómez-Serranillos MP, 2015a. Proanthocyanidins: Antioxidants in neurodegeneration. In: Proanthocyanidins: Food sources, antioxidant properties and health benefits, (Ed.) Ingrid Sullivan, Nova Publishers New York, pp. 41-72.
- González-Burgos E, Fernandez-Moriano C, Gómez-Serranillos MP, 2015b. Potential neuroprotective activity of Ginseng in Parkinson's disease: a review. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 10(1): 14-29.
- González-Cabo P, Palau F, 2013. Mitochondrial pathophysiology in Friedreich's ataxia. *Journal of Neurochemistry*, 126(Suppl.1): 53-64.
- González-Polo RA, Pizarro-Estrella E, Yakhine-Diop SM, Rodríguez-Arribas M, Gómez-Sánchez R, Pedro JM, Fuentes JM, 2015. Is the Modulation of Autophagy the Future in the Treatment of Neurodegenerative Diseases? *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 15(21): 2152-217.
- González-Tejero MR, Martínez-Lirola MJ, Casares-Porcel M, Molero-Mesa J, 1995. Three lichen used in popular medicine in Eastern Andalusia (Spain). *Economic Botany*, 49(1): 96-98.
- Gordon GR, Mulligan SJ, MacVicar BA, 2007. Astrocyte control of the cerebrovasculature. *Glia*, 55: 1214-1221.
- Goyal MM, Basak A, 2010. Human catalase: looking for complete identity. *Protein and Cell*, 1(10): 888-897.
- Granado N, Lastres-Becker I, Ares-Santos S, Oliva I, Martín E, Cuadrado A, Moratalla R, 2011. Nrf2 deficiency potentiates methamphetamine-induced dopaminergic axonal damage and gliosis in the striatum. *Glia*, 59(12): 1850-1863.
- Granado-Serrano AB, Martín MA, Bravo L, Goya L, Ramos S, 2012. Quercetin modulates Nrf2 and glutathione-related defenses in HepG2 cells: Involvement of p38. *Chemico Biological Interactions*, 195(2): 154-164.
- Greco T, Fiskum G, 2010. Neuroprotection through stimulation of mitochondrial antioxidant protein expression. *Journal of Alzheimers Disease*, 20(Suppl.2): S427-437.
- Greshake B, Zehr S, Dal Grande F, Meiser A, Schmitt I, Ebersberger I, 2016. Potential and pitfalls of eukaryotic metagenome skimming: a test case for lichens. *Molecular Ecology Resources*, 16: 511-523.
- Grotto D, Santa Maria LD, Boeira S, Valentini J, Charão MF, Moro AM, Nascimento PC, Pombum VJ, Garcia SC, 2007. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43(2): 619-624.
- Grube M, Blaha J, 2003. On the phylogeny of some polyketide synthase genes in the lichenized genus *Lecanora*. *Mycological Research*, 107(Pt 12): 1419-1426.
- Grube M, Hawksworth DL, 2007. Trouble with lichen: the re-evaluation and re-interpretation of thallus form and fruit body types in the molecular era. *Mycological Research*, 111(Pt 9): 1116-1132.
- Gubellini P, Kachidian P, 2015. Animal models of Parkinson's disease: An updated overview. *Revue Neurologique (Paris)*, 171(11): 750-761.
- Gudjónsdóttir GA, Ingólfssdóttir K, 1997. Quantitative determination of protolichesterinic- and fumarprotocetraric acids in *Cetraria islandica* by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 757(1): 303-306.
- Guerra-Araiza C, Álvarez-Mejía AL, Sánchez-Torres S, Farfan-García E, Mondragón-Lozano R, Pinto-Almazán R, Salgado-Ceballos H, 2013. Effect of natural exogenous antioxidants on aging and on neurodegenerative diseases. *Free Radical Research*, 47(6-7): 451-462.
- Guillamón-Vivancos T, Gómez-Pinedo U, Matías-Guiu J, 2015. Astrocytes in neurodegenerative diseases (I): function and molecular description. *Neurologia*, 30(2): 119-129.
- Gülçin I, Oktay M, Küfrevioğlu OI, Aslan A, 2002. Determination of antioxidant activity of lichen *Cetraria islandica* (L) Ach. *Journal of Ethnopharmacology*, 79: 325-329.
- Gump JM, Thorburn A, 2011. Autophagy and apoptosis: what is the connection? *Trends in Cell Biology*, 21(7): 387-392.
- Güvenç A, Akkol EK, Süntar I, Keles H, Yıldız S, Calis I, 2012. Biological activities of *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf extracts and isolation of the active compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, 144: 726-734.
- Hager A, Brunauer G, Türk R, Stocker-Wörgötter E, 2008. Production and bioactivity of common lichen metabolites as exemplified by *Heterodea muelleri*. (Hampe) Nyl. *Journal of Chemical Ecology*, 34: 113-120.
- Halassa MM, Florian C, Fellin T, Munoz JR, Lee SY, Abel T, Haydon PG, Frank MG, 2009. Astrocytic modulation of sleep homeostasis and cognitive consequences of sleep loss. *Neuron*, 61(2): 213-219.
- Hale ME, 1974. New combinations in the lichen genus *Parmotrema* Massalongo. *Phytologia*. 28(4): 334-339.
- Halici M, Odabasoglu F, Suleyman H, Cakir A, Aslan A, Bayir Y, 2005. Effects of water extract of *Usnea longissima* on antioxidant enzyme activity and mucosal damage caused by indomethacin in rats. *Phytomedicine*, 12: 656-662.

- Halliwell B, 2001. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging*, 18(9): 685-716
- Halliwell B, 2003. Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? *FEBS Letters*, 540: 3-6.
- Halliwell B, 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry*, 97(6): 1634-1658.
- Halliwell B, 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35(Pt 5): 1147-1150.
- Halliwell B, Gutteridge JMC, 1995. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 18: 125-126.
- Halliwell B, Gutteridge JMC, 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed., Clarendon Press, Oxford.
- Halliwell B, Whiteman M, 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142(2): 231-255.
- Harrison JF, Hollensworth SB, Spitz DR, Copeland WC, Wilson GL, LeDoux SP, 2005. Oxidative stress-induced apoptosis in neurons correlates with mitochondrial DNA base excision repair pathway imbalance. *Nucleic Acids Research*, 33(14): 4660-4671.
- Hauck M, Huneck S, 2007. The putative role of fumarprotocetraric acid in the manganese tolerance of the lichen *Lecanora conizaeoides*. *Lichenologist*, 39: 301-304.
- Hawkins RA, O'Kane RL, Simpson IA, Viña JR, 2006. Structure of the blood-brain barrier and its role in the transport of amino acids. *Journal of Nutrition*, 136(1Suppl): 218S-226S.
- Hawksworth DL, Iturriaga T, Crespo A, 2005. Líquenes como bioindicadores inmediatos de contaminación y cambios medio-ambientales en los trópicos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 22: 71-82.
- Hawksworth DL, 1988. The variety of fungal-algal symbioses, their evolutionary significance, and the nature of lichens. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 96(1): 3-20.
- Hawksworth DL, 2015. Lichenization: The origins of a fungal life-style. In: Upreti DK, Divakar PK, Shukla V, Bajpai R (ed.), *Recent Advances in Lichenology: Modern Methods and Approaches in Lichen Systematics and Culture Techniques*, Volumen 2. Springer, India, pp. 1-11.
- Hawksworth DL, Honegger R, 1994. The lichen thallus: a symbiotic phenotype of nutritionally specialized fungi and its response to gall producers. In: Williams MAJ (ed.), *Plant Galls: Organisms, Interactions, Populations*. Clarendon Press, Oxford, pp. 77-98.
- He M, Siow RC, Sugden D, Gao L, Cheng X, Mann GE, 2011. Induction of HO-1 and redox signaling in endothelial cells by advanced glycation end products: a role for Nrf2 in vascular protection in diabetes. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases*, 21: 277-285.
- Heggland I, Kaur P, Syversen T, 2009. Uptake and efflux of methylmercury in vitro: comparison of transport mechanisms in C6, B35 and RBE4 cells. *Toxicology In Vitro*, 23(6): 1020-1027.
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Thorsten Lumbsch H, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai YC, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Kõljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miadlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schüssler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao YJ, Zhang N, 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111(Pt 5): 509-547.
- Hickman RA, Fastin A, Wisniewski T, 2016. Alzheimer Disease and Its Growing Epidemic: Risk Factors, Biomarkers, and the Urgent Need for Therapeutics. *Neurologic Clinics*, 34(4): 941-953.
- Hidalgo ME, Fernández E, Quilhot W, Lissi E, 1994. Antioxidant activity of depsides and depsidones. *Phytochemistry*, 37: 1585-1587.
- Hipólito L, Sánchez MJ, Polache A, Granero L, 2007. Brain metabolism of ethanol and alcoholism: an update. *Current Drug Metabolism*, 8(7): 716-727.
- Hirrlinger J, Dringen R, 2010. The cytosolic redox state of astrocytes: Maintenance, regulation and functional implications for metabolite trafficking. *Brain Research Reviews*, 63(1-2): 177-188.
- Hisatomi T, Ishibashi T, Miller JW, Kroemer G, 2009. Pharmacological inhibition of mitochondrial membrane permeabilization for neuroprotection. *Experimental Neurology*, 218: 347-352.
- Hissin PJ, Hilf RA, 1976. Fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry*, 74: 214-226.
- Hitomi J, Katayama T, Taniguchi M, Honda A, Imaizumi K, Tohyama M, 2004. Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress depends on activation of caspase-3 via caspase-12. *Neuroscience Letters*, 357(2): 127-130.
- Holly J, Perks C, 2006. The role of insulin-like growth factor binding proteins. *Neuroendocrinology*, 83: 154-160.
- Holt C, Yandell M, 2011. MAKER2: an annotation pipeline and genome-database management tool for second-generation genome projects. *BMC Bioinformatics*, 12: 491.
- Honda NK, Vilegas W, 1999. A química dos líquens. *Química Nova*, 21(1): 110-125.
- Honegger R, 1996. Morphogenesis. In: Nash TH III (ed) *Lichen biology*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 65-87.

- Honegger R, 1998. The lichen symbiosis-what is so spectacular about it? *Lichenologist*, 30: 193-212.
- Hopwood DA, 1997. Genetic contributions to understanding polyketide synthases. *Chemical Reviews*, 97: 2465e2497.
- Horáková L, 2011. Flavonoids in prevention of diseases with respect to modulation of Ca-pump function. *Interdisciplinary Toxicology*, 4(3): 114-124.
- Huang Z, Adachi H, 2016. Natural Compounds Preventing Neurodegenerative Diseases through Autophagic Activation. *Journal of UOEH*, 38(2): 139-148.
- Huber JD, Egleton RD, Davis TP, 2001. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends in Neuroscience*, 24(12): 719-725.
- Huneck S, 1999. The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften*, 86(12): 559-570.
- Huneck S, 2001. New Results on the Chemistry of Lichen Substances. In: *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Springer-Verlag, Wien. Vol. 81, pp 1-276.
- Hung CW, Chen YC, Hsieh WL, Chiou SH, Kao CL, 2010. Ageing and neurodegenerative diseases. *Ageing Research Reviews*, 9(Suppl.1): S36-46.
- Huson DH, Beier S, Flade I, Górka A, El-Hadidi M, Mitra S, Ruscheweyh H-J, Tappu R, 2016. MEGAN Community Edition - Interactive Exploration and Analysis of Large-Scale Microbiome Sequencing Data. *PLoS Computational Biology*, 12(6): e1004957.
- Huttner C, Beuerle T, Scharnhop H, Ernst L, Beerhues L, 2010. Differential effect of elicitors on biphenyl and dibenzofuran formation in *Sorbus aucuparia* cell cultures. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58: 11977-11984.
- Illana-Esteban C, 2012. Lichens used in traditional medicine. *Boletín de la Sociedad Micológica de Madrid*, 36: 163-174.
- Ingólfssdóttir K, Hjalmarsdóttir MA, Sigurdsson A, Gudjonsdóttir GA, Brynjólfssdóttir A, Steingrímsson O, 1997. *In vitro* susceptibility of *Helicobacter pylori* to protolicheterinic acid from the lichen *Cetraria islandica*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41: 215-217.
- Isin EM, Guengerich FP, 2007. Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770(3): 314-329.
- Jazwa A, Cuadrado A, 2010. Targeting heme oxygenase-1 for neuroprotection and neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Current Drug Targets*, 11(12): 1517-1531.
- Jenner P, 1998. Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 13(Suppl.1): 24-34.
- Jenner P, 2003. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 53: S26-S36.
- Jessen KR, 2004. Glial cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36(10): 1861-1867.
- Jiang XW, Bai JP, Zhang Q, Hu XL, Tian X, Zhu J, Liu J, Meng WH, Zhao QC, 2016. Caffeoylquinic Acid Derivatives Protect SH-SY5Y Neuroblastoma Cells from Hydrogen Peroxide-Induced Injury Through Modulating Oxidative Status. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *in press*, doi:10.1007/s10571-016-0387-7.
- Johanson CE, Stopa EG, McMillan PN, 2011. The blood-cerebrospinal fluid barrier: structure and functional significance. *Methods in Molecular Biology*, 686: 101-131.
- Joshi G, Johnson JA, 2012. The Nrf2-ARE pathway: a valuable therapeutic target for the treatment of neurodegenerative diseases. *Recent Patents in CNS Drug Discovery*, 7(3): 218-229.
- Joshi NA, Fass JN, 2011. Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33). Software available at <https://github.com/najoshi/sickle>.
- Joshi Y, Wang XY, Lee YM, Byun BK, Koh YJ, Hur JS, 2009. Notes on Some New Records of Macro- and Micro-lichens from Korea. *Mycobiology*, 37(3): 197-202.
- Joyner PM, Cichewicz RH, 2011. Bringing natural products into the fold - exploring the therapeutic lead potential of secondary metabolites for the treatment of protein-misfolding-related neurodegenerative diseases. *Natural Products Reports*, 28(1): 26-47.
- Ju HY, Chen SC, Wu KJ, Kuo HC, Hseu YC, Ching H, Wu CR, 2012. Antioxidant phenolic profile from ethyl acetate fraction of *Fructus Ligustri Lucidi* with protection against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in SH-SY5Y cells. *Food and Chemical Toxicology*, 50(3-4): 492-502.
- Kaizaki A, Tanaka S, Ishige K, Numazawa S, Yoshida T, 2006. The neuroprotective effect of heme-oxygenase (HO) on oxidative stress in HO-1 siRNA transfected HT22 cells. *Brain Research*, 1108: 39-44.
- Kalia LV, Kalia SK, McLean PJ, Lozano AM, Lang AE, 2013.  $\alpha$ -Synuclein oligomers and clinical implications for Parkinson disease. *Annals of Neurology*, 73: 155-169.
- Kamat PK, Kalani A, Kyles P, Tyagi SC, Tyagi N, 2014. Autophagy of mitochondria: a promising therapeutic target for neurodegenerative disease. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 70(2): 707-719.
- Kang KW, Lee SJ, Kim SG, 2005. Molecular mechanism of nrf2 activation by oxidative stress. *Antioxidant and Redox Signalling*, 7(11-12): 1664-1673.
- Karakus B, Odabasoglu F, Cakir A, Halici Z, Bayir Y, Halici M, Aslan A, Suleyman H, 2009. The effects of methanol extract of *Lobaria pulmonaria*, a lichen species, on indometacin-induced gastric mucosal damage, oxidative stress and neutrophil infiltration. *Phytotherapy Research*, 23(5): 635-639.

- Kärkkäinen V, Pomeschchik Y, Savchenko E, Dhungana H, Kurronen A, Lehtonen S, Naumenko N, Tavi P, Levonen AL, Yamamoto M, Malm T, Magga J, Kanninen KM, Koistinaho J, 2014. Nrf2 regulates neurogenesis and protects neural progenitor cells against A $\beta$  toxicity. *Stem Cells*, 32(7): 1904-1916.
- Katayama Y, Inaba T, Nito C, Ueda M, Katsura K, 2014. Neuroprotective effects of erythromycin on cerebral ischemia reperfusion-injury and cell viability after oxygen-glucose deprivation in cultured neuronal cells. *Brain Research*, 1588: 159-167.
- Katz JS, Dimachkie MM, Barohn RJ, 2015. Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Historical Perspective. *Neurologics Clinics*, 33(4): 727-734.
- Keating DJ, 2008. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, regulation of exocytosis and their relevance to neurodegenerative diseases. *Journal of Neurochemistry*, 104(2): 298-305.
- Kelly LJ, Hollingsworth PM, Coppins BJ, Ellis CJ, Harrold P, Tosh J, Yahr R, 2011. DNA barcoding of lichenized fungi demonstrates high identification success in a floristic context. *New Phytologist*, 191(1): 288-300.
- Kelsey NA, Wilkins HM, Linseman DA, 2010. Nutraceutical antioxidants as novel neuroprotective agents. *Molecules*, 15(11): 7792-7814.
- Kempe C, Grüning H, Stasche N, Hörmann K, 1997. Icelandic moss lozenges in the prevention or treatment of oral mucosa irritation and dried out throat mucosa. *Laryngologie, Rhinologie, Otologie*, 76: 186-188.
- Kim GH, Kim JE, Rhie SJ, Yoon S, 2015. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Experimental Neurobiology*, 24(4): 325-340.
- Kim H, Moon JY, Ahn KS, Cho SK, 2013. Quercetin induces mitochondrial mediated apoptosis and protective autophagy in human glioblastoma U373MG cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013: 596496.
- Kim HS, Quon MJ, Kim JA, 2014. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. *Redox Biology*, 2: 187-195.
- Kim MS, Cho HB, 2007. Melanogenesis inhibitory effects of methanolic extracts of *Umbilicaria esculenta* and *Usnea longissima*. *Journal of Microbiology*, 45: 578-582.
- Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA, Ainsworth GC, Bisby GR, 2011. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. 10th edition, ed. Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA. CABI Europe, United Kingdom.
- Kitada M, Koya D, 2013. Renal protective effects of resveratrol. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013: 568093.
- Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, et al., 2012. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*, 8(4): 445-544.
- Kobayashi A, Kang MI, Watai Y, Tong KI, Shibata T, Uchida K, Yamamoto M, 2006. Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Molecular and Cellular Biology*, 26(1): 221-229.
- Kobayashi M, Yamamoto M, 2005. Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxidants and Redox Signalling*, 7(3-4): 385-394.
- Koh JY, Choi DW, 1987. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *Journal of Neuroscience Methods* 20, 83-90.
- Könczöl A, Müller J, Földes E, Béni Z, Végh K, Kéry A, Balogh GT, 2013. Applicability of a blood-brain barrier specific artificial membrane permeability assay at the early stage of natural product-based CNS drug discovery. *Journal of Natural Products*, 76(4): 655-663.
- Kosanić M, Manojlović N, Janković S, Stanojković T, Ranković B, 2013. *Evernia prunastri* and *Pseudoevernia furfuraceae* lichens and their major metabolites as antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *Food and Chemical Toxicology*, 53: 112-118.
- Kosanić M, Ranković B, Stanojković T, Rančić A, Manojlović N, 2014. *Cladonia* lichens and their major metabolites as possible natural antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *LWT - Food Science and Technology*, 59(1): 518-525.
- Kotan E, Alpsoy L, Anar M, Aslan A, Agar G, 2011. Protective role of methanol extract of *Cetraria islandica* (L.) against oxidative stress and genotoxic effects of AFB<sub>1</sub> in human lymphocytes *in vitro*. *Toxicology and Industrial Health*, 27(7): 599-605.
- Kovacic P, Pozos RS, Somanathan R, Shangari N, O'Brien PJ, 2005. Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: Focus on electron transfer, free radicals, and structure-activity relationships. *Current Medicinal Chemistry*, 12: 2601-2623.
- Kranner I, Beckett R, Hochman A, Nash III TH, 2008. Desiccation-Tolerance in Lichens: A Review. *The Bryologist*, 111(4): 576-593.
- Kroken S, Glass NL, Taylor JW, Yoder OC, Turgeon BG, 2003. Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomycetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 100: 15670-15675.
- Kumar A, Singh A, 2015. A review on mitochondrial restorative mechanism of antioxidants in Alzheimer's disease and other neurological conditions. *Frontiers in Pharmacology*, 6: 206.
- Kuosmanen SM, Viitala S, Laitinen T, Peräkylä M, Pölönen P, Kansanen E, Leinonen H, Raju S, Wienecke-Baldacchino A, Närvänen A, Poso A, Heinäniemi M, Heikkinen S, Levonen AL, 2016. The Effects of Sequence Variation

- on Genome-wide NRF2 Binding--New Target Genes and Regulatory SNPs. *Nucleic Acids Research*, 44(4): 1760-1775.
- Kurien BT, Dorri Y, Dillon S, Dsouza A, Scofield RH, 2011. An overview of Western blotting for determining antibody specificities for immunohistochemistry. *Methods in Molecular Biology*, 717: 55-67.
- Kwon SH, Hong SI, Ma SX, Lee SY, Jang CG, 2015. 3',4',7-Trihydroxyflavone prevents apoptotic cell death in neuronal cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology*, 80: 41-51.
- Lakey-Beitia J, Berrocal R, Rao KS, Durant AA, 2015. Polyphenols as therapeutic molecules in Alzheimer's disease through modulating amyloid pathways. *Molecular Neurobiology*, 51(2): 466-479.
- Lalkovičová M, Danielisová V, 2016. Neuroprotection and antioxidants. *Neural Regeneration Research*, 11(6): 865-874.
- Landete JM, 2013. Dietary intake of natural antioxidants: vitamins and polyphenols. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(7): 706-721.
- Lash LH, 2006. Mitochondrial glutathione transport: physiological, pathological and toxicological implications. *Chemico Biological Interactions*, 163: 54-67.
- Launert E, 1981. *Edible and Medicinal Plants*. London: Hamlyn Publisher.
- Lavoie S, Allaman I, Petit JM, Do KQ, Magistretti PJ, 2011. Altered glycogen metabolism in cultured astrocytes from mice with chronic glutathione deficit; relevance for neuroenergetics in schizophrenia. *PLoS One*, 6(7): e22875.
- Lawrey JD, 1989. Lichen Secondary Compounds: Evidence for a Correspondence between Antiherbivore and Antimicrobial Function. *The Bryologist*, 92(3): 326-328.
- Le Pogam P, Herbette G, Boustie J, 2014. Analysis of Lichen Metabolites, a Variety of Approaches. . In: Upreti DK, Divakar PK, Shukla V, Bajpai R (ed.), *Recent Advances in Lichenology: Modern Methods and Approaches in Biomonitoring and Bioprospection*, Volumen 1. Springer, India, pp. 229-261.
- Le SQ, Gascuel O, 2008. An improved general amino acid replacement matrix. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7): 1307-1320.
- Leavitt SD, Esslinger TL, Spribille T, Divakar PK, Lumbsch HT, 2013. Multilocus phylogeny of the lichen-forming fungal genus *Melanohalea* (Parmeliaceae, Ascomycota): Insights on diversity, distributions, and a comparison of species tree and concatenated topologies. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66: 138-152.
- LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC, 1992. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology*, 5(2): 227-231.
- Lee KA, Kim MS, 2000. Glucosidase inhibitor from *Umbilicaria esculenta*. *Canadian Journal of Microbiology*, 46: 1077-1081.
- Lee KA, Kim MS, 2005. Antiplatelet and antithrombotic activities of methanol extract of *Usnea longissima*. *Phytotherapy Research*, 19: 1061-1064.
- Lee MY, Choi EJ, Lee MK, Lee JJ, 2013. Epigallocatechin gallate attenuates L-DOPA-induced apoptosis in rat PC12 cells. *Nutrition Research and Practice*, 7: 249-255.
- Lei K, Nimnual A, Zong WX, Kennedy NJ, Flavell RA, Thompson CB, Bar-Sagi D, Davis RJ, 2002. The BAX subfamily of Bcl2-related proteins is essential for apoptotic signal transduction by c-Jun NH(2)-terminal kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 22(13): 4929-4942.
- Lemasters JJ, Theruvath TP, Zhong Z, Nieminen AL, 2009. Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1787(11): 1395-1401.
- Li J, Liu CN, Wei N, Li XD, Liu YY, Yang R, Jia YJ, 2016. Protective effects of BAY 73-6691, a selective inhibitor of phosphodiesterase 9, on amyloid- $\beta$  peptides-induced oxidative stress in *in-vivo* and *in-vitro* models of Alzheimer's disease. *Brain Research*, 1642: 327-335.
- Li J, O W, Li W, Jiang ZG, Ghanbari HA, 2013. Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(12): 24438-24475.
- Li L, Zhang QG, Lai LY, Wen XJ, Zheng T, Cheung CW, Zhou SQ, Xu SY, 2013. Neuroprotective effect of ginkgolide B on bupivacaine-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013: 159864.
- Li YF, Tsai KJ, Harvey CJ, Li JJ, Ary BE, Berlew EE, Boehman BL, Findley DM, Friant AG, Gardner CA, Gould MP, Ha JH, Lilley BK, McKinstry EL, Nawal S, Parry RC, Rothchild KW, Silbert SD, Tentilucci MD, Thurston AM, Wai RB, Yoon Y, Aiyar RS, Medema MH, Hillenmeyer ME, Charkoudian LK, 2016. Comprehensive curation and analysis of fungal biosynthetic gene clusters of published natural products. *Fungal Genetic Biology*, 89: 18-28.
- Liba CM, Ferrara FIS, Mangio GP, Fantinatti-Garboggini F, Albuquerque RC, Pavan C, Ramos PL, Moreira-Filho CA, Barbosa CR, 2006. Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated from cyanobacteria-deprived lichens and their ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phytohormones. *Journal of Applied Microbiology*, 101: 1076-1086.
- Lin JH, Yamazaki M, 2003. Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications. *Clinical Pharmacokinetics*, 42(1): 59-98.
- Lin MT, Beal MF, 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative disease. *Nature*, 443: 787-795.

- Lin TK, Chen SD, Chuang YC, Lin HY, Huang CR, Chuang JH, Wang PW, Huang ST, Tiao MM, Chen JB, Liou CW, 2014. Resveratrol partially prevents rotenone-induced neurotoxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells through induction of heme oxygenase-1 dependent autophagy. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(1): 1625-1646.
- Lipinski B, 2011. Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2011: 809696.
- Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ, 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advances in Drug Delivery Reviews*, 46(1-3): 3-26.
- Llano GA, 1948. Economic uses of lichens. *Economic Botany*, 2: 15-45.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J, 2000. Overview of neuron structure and function. In: *Molecular Cell Biology* (4th ed.), WH Freeman. New York.
- Loft S, Poulsen HE, 1996. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *Journal of Molecular Medicine* (Berlin, Germany), 74(6): 297-312.
- López A, Cortés F, Gutiérrez BM, Vázquez MC, 2006. Estudios y traducción. *Dioscórides*. Manuscrito de Salamanca. Ediciones Universidad Salamanca.
- López E, Figueroa S, Oset-Gasque MJ, González MP, 2003. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced by cadmium in cortical neurons in culture. *British Journal of Pharmacology*, 138(5): 901-911.
- Louneva N, Cohen JW, Han LY, Talbot K, Wilson RS, Bennett DA, Trojanowski JQ, Arnold SE, 2008. Caspase-3 is enriched in postsynaptic densities and increased in Alzheimer's disease. *American Journal of Pathology*, 173(5): 1488-1495.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1): 265-275.
- Lu GD, Shen HM, Ong CN, Chung MC, 2007. Anticancer effects of aloe-emodin on HepG2 cells: Cellular and proteomic studies. *Proteomics Clinical Applications*, 1(4): 410-419.
- Lu SC, 2013. Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(5): 3143-3153.
- Lumbsch HT, 1998. The Use of Metabolic Data in Lichenology at the Species and Subspecific Levels. *The Lichenologist*, 30(4-5): 357-367.
- Lumbsch HT, Ahti T, Altermann S, Amo De Paz G, Aptroot A, Arup U, Peña AB, Bawingan PA, Benatti MN, Betancourt L, Björk CR, Boonpragob K, Brand M, Bungartz F, Cáceres MES, Candan M, Chaves JL, Clerc P, Common R, Coppins BJ, Crespo A, Dal-Forno M, Divakar PK, Duya MV, Elix JA, Elvebakk A, Fankhauser JD, Farkas E, Ferraro LI, Fischer E, Galloway DJ, Gaya E, Giralte M, Goward T, Grube M, Hafellner J, Hernández MJE, Campos MDLAH, Kalb K, Kärnefelt I, Kantvilas G, Killmann D, Kirika P, Knudsen K, Komposch H, Kondratyuk S, Lawrey JD, Mangold A, Marcelli MP, Mccune B, Messuti MI, Michlig A, González RM, Moncada B, Naikati A, Nelsen MP, Øvstedal DO, Palice Z, Papong K, Parnmen S, Pérez-Ortega S, Printzen C, Rico VJ, Plata ER, Robayo J, Rosabal D, Ruprecht U, Allen NS, Sancho L, De Jesus LS, Vieira TS, Schultz M, Seaward MRD, Sérusiaux E, Schmitt I, Sipman HJM, Sohrabi M, Søchting U, Søgaard MZ, Sparrius LB, Spielmann A, Spribille T, Sutjaritturakan J, Thammathaworn A, Thell A, Thor G, Thüs H, Timdal E, Truong C, Türk R, Tenorio LU, Upreti DK, Boom PVD, Rebuelta MV, Wedin M, Will-Wolf S, Wirth V, Wirtz N, Yahr R, Yeshitela K, Ziemmeck F, Wheeler T, Lücking R, 2011. One hundred new species of lichenized fungi, a signature of undiscovered global diversity. In: *Phytotaxa*. Auckland, New Zealand: Magnolia Press, 18: 1-127.
- Lumbsch HT, Huhndorf SH, 2010. Myconet, 14. Outline of Ascomycota. *Field, Life Earth Sciences*, 1: 1-64.
- Lumbsch HT, Leavitt SD, 2011. Goodbye morphology? A paradigm shift in the delimitation of species in lichenized fungi. *Fungal Diversity*, 50: 59.
- Luo H, Li C, Kim JC, Liu Y, Jung JS, Koh YJ, Hur JS, 2013. Biruloquinone, an acetylcholinesterase inhibitor produced by lichen-forming fungus *Cladonia macilenta*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(2): 161-166.
- Luo H, Wei XL, Han KS, Koh YJ, Hur JS, 2007. Taxonomic study on the lichen genus *Cetrelia* (*Lecanorales*, *Ascomycota*) in South Korea. *Mycobiology*, 35(3): 117-123.
- Lutzoni F, Pagel M, Reeb V, 2001. Major fungal lineages derived from lichen symbiotic ancestors. *Nature*, 411: 937-940.
- Madgula VL, Avula B, Yu YB, Wang YH, Tchantchou F, Fisher S, Luo Y, Khan IA, Khan SI, 2010. Intestinal and blood-brain barrier permeability of ginkgolides and bilobalide: *in vitro* and *in vivo* approaches. *Planta Medica* 76: 599-606.
- Maiese K, Chong ZZ, Wang S, Shang YC, 2012. Oxidant stress and signal transduction in the nervous system with the PI 3-K, Akt, and mTOR cascade. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11): 13830-13866.
- Malhotra S, Subban R, Singh A, 2007. Lichens- Role in Traditional Medicine and Drug Discovery. *The Internet Journal of Alternative Medicine*, 5: 2.
- Mandel SA, Amit T, Weinreb O, Youdim MB, 2011. Understanding the broad-spectrum neuroprotective action profile of green tea polyphenols in aging and neurodegenerative diseases. *Journal of Alzheimer Disease*, 25(2): 187-208.

- Manter DK, Vivanco JM, 2007. Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis, *Journal of Microbiological Methods*, 71(1): 7-14.
- Marante FJT, Castellano AG, Rosas FE, Aguiar JQ, Barrera JB, 2003. Identification and quantitation of allelochemicals from the lichen *Lethariella canariensis*: phytotoxicity and antioxidative activity. *Journal of Chemical Ecology*, 29: 2049-2071.
- Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M, 2008. Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *The FEBS Journal*. 275(15): 3959-3970.
- Marinho HS, Real C, Cyrne L, Soares H, Antunes F, 2014. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biology*, 2: 535-562.
- Mark K, Cornejo C, Keller C, Flück D, Scheidegger C, 2016. Barcoding lichen-forming fungi using 454 pyrosequencing is challenged by artifactual and biological sequence variation. *Genome*, 59(9): 685-704.
- Marklund SL, Westman NG, Lundgren E, Roos G, 1982. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. *Cancer Research*, 42: 1955-1961.
- Markoutsas E, Pampalakis G, Niarakis A, Romero IA, Weksler B, Couraud PO, Antimisariis SG, 2011. Uptake and permeability studies of BBB-targeting immunoliposomes using the hCMEC/D3 cell line. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 77(2): 265-274.
- Marques F, Sousa JC, Sousa N, Palha JA, 2013. Blood-brain-barriers in aging and in Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 8: 38.
- Martin HL, Teismann P, 2009. Glutathione - a review on its role and significance in Parkinson's disease. *FASEB Journal*, 23(10): 3263-3272.
- Martin I, Grotewiel MS, 2006. Oxidative damage and age-related functional declines. *Mechanisms of Ageing and Development*, 127(5): 411-423.
- Martin LJ, 2010. Mitochondrial and Cell Death Mechanisms in Neurodegenerative Diseases. *Pharmaceuticals (Basel)*, 3(4): 839-915.
- Martin S, Gonzalez-Burgos E, Carretero ME, Gomez-Serranillos MP, 2011. Neuroprotective properties of Spanish red wine and its isolated polyphenols on astrocytes. *Food Chemistry*, 128: 40-48.
- Martindale JL, Holbrook NJ, 2002. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *Journal of Cellular Physiology*, 192(1): 1-15.
- Mattsson JE, Lai MJ, 1993. *Vulpicida*, a new genus in *Parmeliaceae* (Lichenized Ascomycetes). *Mycotaxon*, 46, 425-428.
- McCall MR, Frei B, 1999. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radical Biology and Medicine*, 26(7-8): 1034-1053.
- McCord JM, 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress. *American Journal of Medicine*, 108(8): 652-659.
- McCord JM, 2002. Superoxide dismutase in aging and disease: an overview. *Methods in Enzymology*, 349: 331-341.
- McDonald TR, Mueller O, Dietrich FS, Lutzoni F, 2013. High-throughput genome sequencing of lichenizing fungi to assess gene loss in the ammonium transporter/ammonia permease gene family. *BMC Genomics*, 14: 225.
- Mecocci P, Polidori MC, 2012. Antioxidant clinical trials in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1822(5): 631-638.
- Medema MH, Kottmann R, Yilmaz P, et al., 2015. Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster. *Nature Chemical Biology*, 11(9): 625-631.
- Melo MG, dos Santos JP, Serafini MR, Caregnato FF, Pasquali MA, Rabelo TK, da Rocha RF, Quintans L Jr, Araújo AA, da Silva FA, Moreira JC, Gelain DP, 2011. Redox properties and cytoprotective actions of atranorin, a lichen secondary metabolite. *Toxicology In Vitro*, 25(2): 462-468.
- Mensch J, Oyarzabal J, Mackie C, Augustijns P, 2009. *In vivo*, *in vitro* and *in silico* methods for small molecule transfer across the BBB. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98: 4429-4468.
- Metea MR, Newman EA, 2006. Glial cells dilate and constrict blood vessels: a mechanism of neurovascular coupling. *Journal of Neuroscience*, 26: 2862-2870.
- Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T, 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop*, 1-8.
- Mira L, Fernandez MT, Santos M, Rocha R, Florêncio MH, Jennings KR, 2002. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radical Research*, 36(11): 1199-1208.
- Mitchell JC, 1965. Allergy to lichens. Allergic contact dermatitis from usnic acid 1292 produced by lichenized fungi. *Archives of Dermatology*, 92: 142-146.
- Mitrović T, Stamenković S, Cvetković V, Tošić S, Stanković M, Radojević I, Stefanović O, Comić L, Dačić D, Curčić M, Marković S, 2011. Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(8): 5428-5448.
- Miyake MM, Bleier BS, 2015. The blood-brain barrier and nasal drug delivery to the central nervous system. *American Journal of Rhinology and Allergy*, 29(2): 124-127.

- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ, 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451(7182): 1069-1075.
- Mizushima N, Yoshimori T, 2007. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, 3(6): 542-545.
- Mohanta TK, Tamboli Y, Zubaidha PK, 2014. Phytochemical and medicinal importance of *Ginkgo biloba* L. *Natural Products Research*, 28(10): 746-752.
- Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW, 1994. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91: 9926-9930.
- Molnár K, Farkas E, 2010. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 65(3-4): 157-173.
- Molyneux P, 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26: 211-219.
- Moody DM, 2006. The blood-brain barrier and blood-cerebral spinal fluid barrier. *Seminars in Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, 10(2): 128-131.
- Moos T, 2002. Brain iron homeostasis. *Danish Medical Bulletin*, 49(4): 279-301.
- Morales JF, Montoto SS, Fagiolino P, Ruiz ME, 2016. Current State and Future Perspectives in QSAR Models to Predict Blood Brain Barrier penetration in Central Nervous System Drug R&D. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, *in press*, doi: 10.2174/1389557516666161013110813.
- Moreira PI, Smith MA, Zhu X, Nunomura A, Castellani RJ, Perry G, 2005. Oxidative stress and neurodegeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1043: 545-552.
- Morris MC, Evans DA, Bienias JL, Tangney CC, Bennett DA, Aggarwal N, Wilson RS, Scherr PA, 2002. Dietary intake of antioxidant nutrients and the risk of incident Alzheimer disease in a biracial community study. *JAMA*, 287: 3230-3237.
- Mosmann T, 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2): 55-63.
- Motohashi H, Yamamoto M, 2004. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends in Molecular Medicine*, 10(11): 549-557.
- Muangpaisan W, Mathews A, Hori H, Seidel D, 2011. A systematic review of the worldwide prevalence and incidence of Parkinson's disease. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 94(6): 749-755.
- Müller K, 2001. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Applied microbiology and biotechnology*, 56(1-2): 9-16.
- Müller MS, Obel LF, Waagepetersen HS, Schousboe A, Bak LK, 2013. Complex actions of ionomycin in cultured cerebellar astrocytes affecting both calcium-induced calcium release and store-operated calcium entry. *Neurochemical Research*, 38(6): 1260-1265.
- Musatov A, Robinson NC, 2012. Susceptibility of mitochondrial electron-transport complexes to oxidative damage. Focus on cytochrome c oxidase. *Free Radical Research*, 46(11): 1313-1326.
- Nabavi SM, Habtemariam S, Daglia M, Braidly N, Loizzo MR, Tundis R, Nabavi SF, 2015. Neuroprotective Effects of Ginkgolide B Against Ischemic Stroke: A Review of Current Literature. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 15(21): 2222-2232.
- Nah J, Yuan J, Jung YK, 2015. Autophagy in neurodegenerative diseases: from mechanism to therapeutic approach. *Molecules and cells*, 38(5): 381-389.
- Narui T, Sawada K, Takatsuki S, Okuyama T, Culbertson CF, Culbertson WL, Shibata S, 1998. NMR assignments of depsides and tridepsides of the lichen family *Umbilicariaceae*. *Phytochemistry*, 48(5): 815-822.
- Nash TH III, 1996. *Lichen Biology*. (Ed.) Cambridge, Cambridge University Press.
- Nash TH, Ryan BD, Gries C, Bungartz F, 2001. *Lichen Flora of the Greater Sonoran Desert Region*. Vol 1. Tempe, AZ.
- Navarro-Yepes J, Zavala-Flores L, Anandhan A, Wang F, Skotak M, Chandra N, Li M, Pappa A, Martinez-Fong D, Del Razo LM, Quintanilla-Vega B, Franco R, 2014. Antioxidant gene therapy against neuronal cell death. *Pharmacology and Therapeutics*, 142(2): 206-230.
- Nelson ED, Ramberg JE, Best T, Sinnott RA, 2012. Neurologic effects of exogenous saccharides: a review of controlled human, animal, and *in vitro* studies. *Nutritional Neuroscience*, 15(4): 149-162.
- Newhouse K, Hsuan SL, Chang SH, Cai B, Wang Y, Xia Z, 2004. Rotenone-induced apoptosis is mediated by p38 and JNK MAP kinases in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *Toxicological Science*, 79(1): 137-146.
- Nguyen Ho-Bouloires TH, Clapéron A, Mergey M, Wendum D, Desbois-Mouthon C, Tahraoui S, Fartoux L, Chettouh H, Merabtene F, Scatton O, Gaestel M, Praz F, Housset C, Fouassier L, 2015. Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 mediates resistance to hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human hepatobiliary cancer cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 89: 34-46.
- Niedzielska E, Smaga I, Gawlik M, Moniczewski A, Stankowicz P, Pera J, Filip M, 2016. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology*, 53(6): 4094-4125.
- Nieuwenhuys R, Voogd J, Van Huijzen C, 2009. *El Sistema Nervioso Central Humano*, tomos 1 y 2. 4ª ed. Editorial Medica Panamericana, Madrid.
- Niki E, 2008. Lipid peroxidation products as oxidative stress biomarkers. *Biofactors*, 34(2): 171-180.



- Nirmaladevi D, Venkataramana M, Chandranayaka S, Ramesha A, Jameel NM, Srinivas C, 2014. Neuroprotective effects of bikaverin on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress mediated neuronal damage in SH-SY5Y cell line. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 34(7): 973-985.
- Niu B, Fu L, Sun S, Li W, 2010. Artificial and natural duplicates in pyrosequencing reads of metagenomic data. *BMC Bioinformatics*, 11: 187.
- Nobelförsamlingen (The Nobel Assembly at Karolinska Institutet), 2016. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2016. Press Release.
- Norinder U, Haeberlein M, 2002. Computational approaches to the prediction of blood brain distribution. *Advanced in Drug Delivery Reviews*, 54: 291-313.
- Nowrousian M, Stajich JE, Chu M, Engh I, Espagne E, Halliday K, Kamerewerd J, Kempken F, Knab B, Kuo HC, Osiewicz HD, Pöggeler S, Read ND, Seiler S, Smith KM, Zickler D, Kück U, Freitag M, 2010. De novo assembly of a 40 Mb eukaryotic genome from short sequence reads: *Sordaria macrospora*, a model organism for fungal morphogenesis. *PLoS Genetics*, 6(4): e1000891.
- Numakawa T, 2014. Possible protective action of neurotrophic factors and natural compounds against common neurodegenerative diseases. *Neural Regeneration Research*, 9(16): 1506-1508.
- Nybakken L, Julkunen-Tiitto R, 2006. UV-B induces usnic acid in reindeer lichens. *The Lichenologist*, 38(5), 477-485.
- O'Brien PJ, Siraki AG, Shangari N, 2005. Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health. *Critical Reviews in Toxicology*, 35(7): 609-662.
- O'Connell J, Schulz-Trieglaff O, Carlson E, Hims MM, Gormley NA, Cox AJ, 2015. NxTrim: optimized trimming of Illumina mate pair reads. *Bioinformatics*, 31(12): 2035-2037.
- Odabasoglu F, Aslan A, Cakir A, Suleyman H, Karagoz Y, Halici M, Bayir Y, 2004. Comparison of antioxidant activity and phenolic content of three lichen species. *Phytotherapy Research*, 18(11): 938-941.
- Odabasoglu F, Cakir A, Suleyman H, Aslan A, Bayir Y, Halici M, Kazaz C, 2006. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 103(1): 59-65.
- Ogmundsdóttir HM, Zoëga GM, Gissurarson SR, Ingólfssdóttir K, 1998. Anti-proliferative effects of lichen-derived inhibitors of 5-lipoxygenase on malignant cell-lines and mitogen-stimulated lymphocytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50: 107-115.
- Oksanen I, 2006. Ecological and biotechnological aspects of lichens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73: 723-734.
- Okuda A, Imagawa M, Maeda Y, Sakai M, Muramatsu M, 1989. Structural and functional analysis of an enhancer GPEI having a phorbol 12-O-tetradecanoate 13-acetate responsive element-like sequence found in the rat glutathione transferase P gene. *Journal of Biological Chemistry*, 264: 16919-16926.
- Olanow CV, Tatton WG, 1999. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annual Reviews in Neuroscience*, 22: 123-144.
- Omanwar S, Fahim M, 2015. Mercury Exposure and Endothelial Dysfunction: An Interplay Between Nitric Oxide and Oxidative Stress. *International Journal of Toxicology*, 34(4): 300-307.
- Onyango IG, Khan SM, 2006. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and stress signaling in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, 3(4): 339-349.
- Organización Mundial de la Salud, 2004. Monografía sobre plantas medicinales seleccionadas. El líquen islandico. Ginebra. Volume 4, 140-148.
- Orthmann A, Fichtner I, Zeisig R, 2011. Improving the transport of chemotherapeutic drugs across the blood-brain barrier. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 4: 477-490.
- Ōsumi Y, 2001. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nature*, 2(3): 211-216.
- Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B, 2007. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, 12(5): 913-922.
- Otten EG, Manni D, Korolchuk VI, 2016. Mitochondrial Degradation, Autophagy and Neurodegenerative Disease. In: *Mitochondrial Dysfunction in Neurodegenerative Disorders*. (Ed.) Reeve AK, Simcox EM, Duchen MR, Turnbull DG. Springer International Publishing, pp. 255-278.
- Ou B, Huang D, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK, 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay: a comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 3122-3128.
- Ouyang YB, Xu L, Yue S, Liu S, Giffard RG, 2014. Neuroprotection by astrocytes in brain ischemia: importance of microRNAs. *Neuroscience Letters*, 565: 53-58.
- Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Spiegelhalter B, Bartsch H, 2000. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal of Cancer*, 36(10): 1235-1247.
- Palmiotti CA, Prasad S, Naik P, Abul KM, Sajja RK, Achyuta AH, Cucullo L, 2014. *In vitro* cerebrovascular modeling in the 21st century: current and prospective technologies. *Pharmaceutical Research*, 31(12): 3229-3250.
- Pamplona R, Constantini D, 2011. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *American Journal of Physiology*, 301: R843-R863.
- Pandareesh MD, Mythri RB, Srinivas Bharath MM, 2015. Bioavailability of dietary polyphenols: Factors contributing to their clinical application in CNS diseases. *Neurochemistry International*, 89: 198-208.

- Pandey KB, Rizvi SI, 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5): 270-278.
- Papadia K, Markoutsas E, Antimisiaris SG, 2016. How do the physicochemical properties of nanoliposomes affect their interactions with the hCMEC/D3 cellular model of the BBB? *International Journal of Pharmaceutics*. 509(1-2): 431-438.
- Papageorgiou IE, Gabriel S, Fetani AF, Kann O, Heinemann U, 2011. Redistribution of astrocytic glutamine synthetase in the hippocampus of chronic epileptic rats. *Glia*, 59: 1706-1718.
- Paradies G, Petrosillo G, Paradies V, Ruggiero FM, 2010. Oxidative stress, mitochondrial bioenergetics, and cardiolipin in aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(10): 1286-1295.
- Patil SB, Ghadyale VA, Taklikar SS, Kulkarni CR, Arvindekar AU, 2011. Insulin secretagogue, alpha-glucosidase and antioxidant activity of some selected spices in streptozotocin-induced diabetic rats. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66: 85-90.
- Paudel B, Bhattarai HD, Kim IC, Lee H, Sofronov R, Ivanova L, Poryadina L, Yim JH, 2014. Estimation of antioxidant, antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of plants collected from Oymyakon region of the Republic of Sakha (Yakutia), Russia. *Biological Research*, 47:10.
- Pavelka M, Roth J, 2010. Central nervous system: neuron, glial cells. In: *Functional Ultrastructure Atlas of Tissue Biology and Pathology*, Springer-Verlag/Wien, pp. 316-317.
- Peden AH, Ironside JW, 2012. Molecular pathology in neurodegenerative diseases. *Current Drug Targets*. 13(12): 1548-1559.
- Pellegrino MW, Haynes CM, 2015. Mitophagy and the mitochondrial unfolded protein response in neurodegeneration and bacterial infection. *BMC Biology*, 13: 22.
- Peng C, Wang X, Chen J, Jiao R, Wang L, Li YM, Zuo Y, Liu Y, Lei L, Ma KY, Huang Y, Chen ZY, 2014. Biology of ageing and role of dietary antioxidants. *Biomed Research International*, 2014: 831841.
- Pengsuparp T, Cai L, Constant H, Fong HHS, Lin LZ, Kinghorn AD, Pezzuto JM, Cordell GA, Ingólfssdóttir K, Wagner H, Hughes SH, 1995. Mechanistic evaluation of new plant-derived compounds that inhibits HIV-1 reverse transcriptase. *Journal of Natural Products*, 58: 1024-1031.
- Pereira J, 1853. *The Elements of Materia Medica and Therapeutics*. Vol. 2, 3th American ed.
- Peri A, 2016. Neuroprotective effects of estrogens: the role of cholesterol. *Journal of Endocrinological Investigation*, 39(1): 11-18.
- Phan CW, David P, Naidu M, Wong KH, Sabaratnam V, 2015. Therapeutic potential of culinary-medicinal mushrooms for the management of neurodegenerative diseases: diversity, metabolite, and mechanism. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(3): 355-368.
- Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L, 2015. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1): 11-26.
- Pickering AM, Staab TA, Tower J, Sieburth D, Davies KJ, 2013. A conserved role for the 20S proteasome and Nrf2 transcription factor in oxidative stress adaptation in mammals, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 216(Pt 4): 543-553.
- Pisoschi AM, Pop A, 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97: 55-74.
- Plóciennik A, Prendecki M, Zuba E, Siudzinski M, Dorszewska J, 2015. Activated Caspase-3 and Neurodegeneration and Synaptic Plasticity in Alzheimer's Disease. *Advances in Alzheimer's Disease*, 4: 63-77.
- Poller B, Gutmann H, Krähenbühl S, Weksler B, Romero I, Couraud PO, Tuffin G, Drewe J, Huwyler J, 2008. The human brain endothelial cell line hCMEC/D3 as a human blood-brain barrier model for drug transport studies. *Journal of Neurochemistry*, 107(5): 1358-1368.
- Pope S, Land JM, Heales SJ, 2008. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegeneration; cardiolipin a critical target? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1777(7-8): 794-799.
- Porres-Martínez M, 2013. Actividad neuroprotectora del aceite esencial de *Salvia lavandulifolia* Vahl. Tesis Doctoral.
- Porres-Martínez M, González-Burgos E, Carretero Accame ME, Gómez-Serranillos MP, 2013. Phytochemical composition, antioxidant and cytoprotective activities of essential oil of *Salvia lavandulifolia* Vahl. *Food Research International*, 54(1): 523-531.
- Porres-Martínez M, González-Burgos E, Carretero ME, Gómez-Serranillos MP, 2015. Major selected monoterpenes  $\alpha$ -pinene and 1,8-cineole found in *Salvia lavandulifolia* (Spanish sage) essential oil as regulators of cellular redox balance. *Pharmaceutical Biology*, 53(6): 921-929.
- Powell EM, Geller HM, 1999. Dissection of astrocyte-mediated cues in neuronal guidance and process extension. *Glia*. 26: 73-83.
- Prat E, Baron P, Meda L, Scarpini E, Galimberti D, Ardolino G, Catania A, Scarlato G, 2000. The human astrocytoma cell line U373MG produces monocyte chemotactic protein (MCP)-1 upon stimulation with beta-amyloid protein. *Neuroscience Letters*, 283(3): 177-180.
- Preston JE, Joan Abbott N, Begley DJ, 2014. Transcytosis of macromolecules at the blood-brain barrier. *Advances in Pharmacology*, 71: 147-163.
- Price DL, Tanzi RE, Borchelt DR, Sisodia SS, 1998. Alzheimer's disease: genetic studies and transgenic models. *Annual Review of Genetics*, 32: 461-493.

- Printzen C, 2009. Lichen Systematics: The Role of Morphological and Molecular Data to Reconstruct Phylogenetic Relationships. *Progress in Botany*, 71: 233-275.
- Procaccio V, Bris C, Chao de la Barca JM, Oca F, Chevrollier A, Amati-Bonneau P, Bonneau D, Reynier P, 2014. Perspectives of drug-based neuroprotection targeting mitochondria. *Revue Neurologique (Paris)*, 170(5): 390-400.
- Qasim M, Aziz I, Rasheed M, Gul B, Khan MA, 2016. Effect of extraction solvents on polyphenols and antioxidant activity of medicinal haplophytes. *Pakistan Journal of Botany*, 48(2): 621-627.
- Rabelo TK, Zeidán-Chuliá F, Vasques LM, dos Santos JP, da Rocha RF, Pasquali MA, Rybarczyk-Filho JL, Araújo AA, Moreira JC, Gelain DP, 2012. Redox characterization of usnic acid and its cytotoxic effect on human neuron-like cells (SH-SY5Y). *Toxicology In Vitro*, 26(2): 304-314.
- Radi E, Formichi P, Battisti C, Federico A, 2014. Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Journal of Alzheimers Disease*, 42(Suppl.3): S125-152.
- Raja HA, Schoch CL, Hustad VP, Shearer CA, Miller AN, 2011. Testing the phylogenetic utility of MCM7 in the Ascomycota. *MycKeys*, 1: 63-94.
- Rajkumar V, Guha G, Kumar RA, 2011. Antioxidant and anti-neoplastic activities of *Picrorhiza kurroa* extracts. *Food and Chemical Toxicology*, 49(2): 363-369.
- Rankovic B, 2014. Lichen Secondary Metabolites. Bioactive properties and pharmaceutical potential. Springer Cham Heidelberg.
- Rankovic B, Mišić M, 2008. The antimicrobial activity of the lichen substances of the lichens *Cladonia furcata*, *Ochrolechia androgyna*, *Parmelia caperata* and *Parmelia conspersa*. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 22: 1013-1016.
- Rankovic B, Mišić M, Sukdolak S, 2008. The antimicrobial activity of substances derived from the lichens *Physcia aipolia*, *Umbilicaria polyphylla*, *Parmelia caperata* and *Hypogymnia physodes*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 1239-1242.
- Rankovic B, Kosanic MM, Stanojkovic TP, 2011. Antioxidant, antimicrobial and anticancer activity of the lichens *Cladonia furcata*, *Lecanora atra* and *Lecanora muralis*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11: 97.
- Rao KV, Panickar KS, Jayakumar AR, Norenberg MD, 2005. Astrocytes protect neurons from ammonia toxicity. *Neurochemical Research*, 30(10): 1311-1318.
- Rappold PM, Tieu K, 2010. Astrocytes and therapeutics for Parkinson's disease. *Neurotherapeutics*, 7(4): 413-423.
- Rathnayake CM, Malalasekera AP, Perera RP, Ratnasooriya WD, 2010. Hypoglycemic activity of methanol and methylene chloride extracts of the lichen *Parmotrema grayana*. *Inventi Impact: Ethnopharmacology*, 2: Inventi:ep/128/10.
- Rausch WD, Liu S, Gille G, Radad K, 2006. Neuroprotective effects of ginsenosides. *Acta Neurobiologiae Experimentalis (Wars)*, 66(4): 369-375.
- Reddy PH, Reddy TP, 2011. Mitochondria as a therapeutic target for aging and neurodegenerative diseases. *Current Alzheimer Research*, 8(4): 393-409.
- Reddy RG, Veeraval L, Maitra S, Chollet-Krugler M, Tomasi S, Lohézic-Le Dévéhat F, Boustie B, Chakravarty S, 2016. Lichen-derived compounds show potential for central nervous system therapeutics. *Phytomedicine*, 23(12): 1527-1534.
- Reddy VP, Zhu X, Perry G, Smith MA, 2009. Oxidative stress in diabetes and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer Disease*, 16: 763-774.
- Rege SD, Geetha T, Griffin GD, Broderick TL, Babu JR, 2014. Neuroprotective effects of resveratrol in Alzheimer disease pathology. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6: 218.
- Reijonen S, Kukkonen JP, Hyrskyluoto A, Kivinen J, Kairisalo M, Takei N, Lindholm D, Korhonen L, 2010. Downregulation of NF-kappaB signaling by mutant huntingtin proteins induces oxidative stress and cell death. *Cell and Molecular Life Sciences*, 67(11): 1929-1241.
- Renaud J, Nabavi SF, Daglia M, Nabavi SM, Martinoli MG, 2015. Epigallocatechin-3-Gallate, a Promising Molecule for Parkinson's Disease? *Rejuvenation Research*, 18(3): 257-269.
- Renner SS, 2016. A Return to Linnaeus's Focus on Diagnosis, Not Description: The Use of DNA Characters in the Formal Naming of Species. *Systematic Biology*, 65(6): 1085-1095.
- Rezanka T, Jachymova J, Dembitsky VM, 2003. Prenylated xanthone glucosides from Ural's lichen *Umbilicaria proboscidea*. *Phytochemistry*, 62: 607-612.
- Ringman JM, Younkin SG, Pratico D, Seltzer W, Cole GM, Geschwind DH, Rodriguez-Agudelo Y, Schaffer B, Fein J, Sokolow S, Rosario ER, Gyls KH, Varpetian A, Medina LD, Cummings JL, 2008. Biochemical markers in persons with preclinical familial Alzheimer disease. *Neurology*, 71: 85-92.
- Rizzini CT, 1952. Emprêgo dos liquens, principalmente em medicina. *Brasil-Méd.* 38-39: 23-30.
- Robb-Gaspers LD, Burnett P, Rutter GA, Denton RM, Rizzuto R, Thomas AP, 1998. Integrating cytosolic calcium signals into mitochondrial metabolic responses. *EMBO Journal*, 17(17): 4987-5000.
- Robertson GS, Crocker SJ, Nicholson DW, Schulz JB, 2000. Neuroprotection by the inhibition of apoptosis. *Brain Pathology*, 10(2): 283-292.
- Rolland SG, Conradt B, 2010. New role of the BCL2 family of proteins in the regulation of mitochondrial dynamics. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(6): 852-858.

- Romeo L, Intrieri M, D'Agata V, Mangano NG, Oriani G, Ontario ML, Scapagnini G, 2009. The major green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate, induces heme oxygenase in rat neurons and acts as an effective neuroprotective agent against oxidative stress. *Journal of the American College of Nutrition*, 28 Suppl: 492S-499S.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, Rahmani Z, Krizus A, McKenna-Yasek D, Cayabyab A, Gaston SM, Berger R, Tanzi RE, Halperin JJ, Herzfeld B, Van Den Bergh R, Hung WY, Bird T, Deng G, Mulder DW, Smyth C, Laing NG, Soriano E, Pericak-Vance A, Haines J, Rouleau GA, Gusella JA, Horvitz HR, Brown Jr RH, 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362: 59-62.
- Roux F, Couraud PO, 2005. Rat brain endothelial cell lines for the study of blood-brain barrier permeability and transport functions. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 25(1): 41-58.
- Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, Park JW, Nakahira K, Wang X, Choi AM, 2007. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxidants and Redox Signaling*, 9(1): 49-89.
- Sabbatini R, 2003. Neurons and synapses: the history of its discovery. *Brain and mind magazine*, 17: 39-40.
- Sadowska-Bartosz I, Bartosz G, 2014. Effect of antioxidants supplementation on aging and longevity. *Biomed Research International*, 2014: 404680.
- Sanai N, Nguyen T, Ihrie RA, Mirzadeh Z, Tsai HH, Wong M, Gupta N, Berger MS, Huang E, Garcia-Verdugo JM, Rowitch DH, Alvarez-Buylla A, 2011. Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature*, 478: 382-386.
- Sanders LH, Greenamyre JT, 2013. Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. *Free Radical Biology and Medicine*, 62: 111-120.
- Santilli F, D'Ardes D, Davì G, 2015. Oxidative stress in chronic vascular disease: From prediction to prevention. *Vascular Pharmacology*, 74: 23-37.
- Sargent JM, 2003. The use of the MTT assay to study drug resistance in fresh tumour samples. *Recent Results in Cancer Research*, 161: 13-25.
- Sastre J, Pallardó FV, Viña J, 2003. The role of mitochondrial oxidative stress in aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 35(1): 1-8.
- Saura-Calixto F, Serrano J, Goñi I, 2007. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101: 492-501.
- Scaduto RC Jr, Grotyohann LW, 1999. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophysical Journal*, 76(1Pt1): 469-477.
- Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45: 287-306.
- Scapagnini G, Vasto S, Abraham NG, Caruso C, Zella D, Fabio G, 2011. Modulation of Nrf2/ARE pathway by food polyphenols: a nutritional neuroprotective strategy for cognitive and neurodegenerative disorders. *Molecular Neurobiology*, 44(2): 192-201.
- Schafer FQ, Buettner GR, 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine*, 30: 1191-1212.
- Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD, 1990. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 54: 823-827.
- Schapira AVH, 1998. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders. *Biochimica et Biophysica Acta: Bioenergetics*, 1366: 225-233.
- Schattenberg JM, Czaja MJ, 2014. Regulation of the effects of CYP2E1-induced oxidative stress by JNK signaling. *Redox Biology*, 3: 7-15.
- Schieber M, Chandel NS, 2014. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, 24(10): R453-462.
- Schipper HM, 2000. Heme oxygenase-1: role in brain aging and neurodegeneration. *Experimental Gerontology*, 35(6-7): 821-830.
- Schmitt I, Lumbsch HT, 2004. Molecular phylogeny of the Pertusariaceae supports secondary chemistry as an important systematic character set in lichen-forming ascomycetes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33(1): 43-55.
- Schmitt I, Martín MP, Kautz S, Lumbsch HT, 2005. Diversity of non-reducing polyketide synthase genes in the Pertusariales (lichenized Ascomycota): a phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 66(11): 1241-1253.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W; Fungal Barcoding Consortium; Fungal Barcoding Consortium Author List; 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16): 6241-6246.
- Schoch CL, Sung GH, López-Giráldez F, Townsend JP, Miadlikowska J, Hofstetter V, Robbertse B, Matheny PB, Kauff F, Wang Z, Gueidan C, Andrie RM, Trippe K, Ciuffetti LM, Wynns A, Fraker E, Hodkinson BP, Bonito G, Groenewald JZ, Arzanlou M, de Hoog GS, Crous PW, Hewitt D, Pfister DH, Peterson K, Gryzenhout M, Wingfield MJ, Aptroot A, Suh SO, Blackwell M, Hillis DM, Griffith GW, Castlebury LA, Rossman AY, Lumbsch HT, Lücking R, Büdel B, Rauhut A, Diederich P, Ertz D, Geiser DM, Hosaka K, Inderbitzin P, Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B, Mostert L, O'Donnell K, Sipman H, Rogers JD, Shoemaker RA,

- Sugiyama J, Summerbell RC, Untereiner W, Johnston PR, Stenroos S, Zuccaro A, Dyer PS, Crittenden PD, Cole MS, Hansen K, Trappe JM, Yahr R, Lutzoni F, Spatafora JW, 2009. The Ascomycota tree of life: a phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. *Systematic biology*, 58(2): 224-239.
- Schug ZT, Gottlieb E, 2009. Cardiolipin acts as a mitochondrial signalling platform to launch apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788(10): 2022-2031.
- Schultz JB, Kindeanu J, Dichgans J, 2000. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *European Journal of Biochemistry*, 267: 4904-4911.
- Seymour FA, Crittenden P, Dyer P, 2005. Sex in the extremes: lichen-forming fungi. *Mycologist*, 19(2): 51-58.
- Shany-Ur T, Rankin KP, 2011. Personality and social cognition in neurodegenerative disease. *Current Opinion in Neurology*, 24(6): 550-555.
- Shaukat Z, Liu D, Hussain R, Khan M, Gregory SL, 2016. The Role of JNK Signalling in Responses to Oxidative DNA Damage. *Current Drug Targets*, 17(2): 154-163.
- Shityakov S, Salvador E, Förster C, 2013. *In silico*, *in vitro* and *in vivo* methods to analyse drug permeation across the blood-brain barrier: A critical review. *OA Anaesthetics*, 1(2): 13.
- Shokolenko I, Venediktova N, Bochkareva A, Wilson GL, Alexeyev MF, 2009. Oxidative stress induces degradation of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Research*, 37: 2539-2548.
- Shrestha G, El-Naggar AM, StClair LL, O'Neill KL, 2015. Anticancer activities of selected species of North American lichen extracts. *Phytotherapy Research*, 29: 100-107.
- Shukla V, Joshi GP, Rawat MS, 2010. Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review. *Phytochemistry Reviews*, 9(2): 303-314.
- Sies H, Cadenas E, 1985. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Biological Sciences*, 311: 617-631.
- Sies H, Stahl W, Sundquist AR, 1992. Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 669: 7-20.
- Simão FA, Waterhouse RM, Ioannidis P, Kriventseva EV, Zdobnov EM, 2015. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, 31(19): 3210-3212.
- Simpkins JW, Yi KD, Yang SH, Dykens JA, 2010. Mitochondrial mechanisms of estrogen neuroprotection. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1800(10): 1113-1120.
- Simpson TJ, 2014. Fungal polyketide biosynthesis - a personal perspective. *Natural Products Reports*, 31(10): 1247-1252.
- Simstein R, Burow M, Parker A, Weldon C, Beckman B., 2003. Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: insights from the MCF-7 cell model system. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, 228(9): 995-1003.
- Singh M, Sharma H, Singh N, 2007. Hydrogen peroxide induces apoptosis in HeLa cells through mitochondrial pathway. *Mitochondrion*, 7(6): 367-373.
- Singh N, Agrawal M, Doré S, 2013. Neuroprotective properties and mechanisms of resveratrol in *in vitro* and *in vivo* experimental cerebral stroke models. *ACS Chemical Neuroscience*, 4(8): 1151-1162.
- Singh S, Swarnkar S, Goswami P, Nath C, 2011. Astrocytes and microglia: responses to neuropathological conditions. *International Journal of Neuroscience*, 121: 589-597.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM, 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299: 152-178.
- Smets I, Caplanusi A, Despa S, Molnar Z, Radu M, VandeVen M, Ameloot M, Steels P, 2004. Ca<sup>2+</sup> uptake in mitochondria occurs via the reverse action of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in metabolically inhibited MDCK cells. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 286(4): F784-794.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC, 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150: 76-85.
- Smriga M, Chen J, Zhang JT, Narui T, Shibata S, Hirano E, Saito H, 1999. Isolichenan, an alpha-glucan isolated from lichen *Cetrariella islandica*, repairs impaired learning behaviors and facilitates hippocampal synaptic plasticity. *Proceedings of the Japan Academy Series B Physical and Biological Sciences*, 75(7): 219-223.
- Solanki I, Parihar P, Mansuri ML, Parihar MS, 2015. Flavonoid-based therapies in the early management of neurodegenerative diseases. *Advances in Nutrition*, 6(1): 64-72.
- Solanki I, Parihar P, Parihar MS, 2016. Neurodegenerative diseases: From available treatments to prospective herbal therapy. *Neurochemistry International*, 95: 100-108.
- Solhaug KA, Lind M, Nybakken L, Gauslaa Y, 2009. Possible functional roles of cortical depsides and medullary depsidones in the foliose lichen *Hypogymnia physodes*. *Flora*, 204: 40-48.
- Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T, 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 579(1-2): 200-213.
- Sosa V, Moliné T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, Lleonart ME, 2013. Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Research Reviews*, 12(1): 376-390.
- Stack EC, Matson WR, Ferrante RJ, 2008. Evidence of oxidant damage in Huntington's disease: translational strategies using antioxidants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1147: 79-92.

- Stahl W, Sies H, 2003. Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24(6): 345-351.
- Stamatakis A, 2006. Raxml-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22: 2688-2690.
- Stamatovic SM, Keep RF, Andjelkovic AV, 2008. Brain endothelial cell-cell junctions: how to 'open' the blood brain barrier. *Current Neuropharmacology*, 6: 179-192.
- Stanzione P, Tropepi D, 2011. Drugs and clinical trials in neurodegenerative diseases. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, 47(1): 49-54.
- Staunton J, Weissman KJ, 2001. Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Natural Products Reports*, 18(4): 380-416.
- Steele ML, Robinson SR, 2012. Reactive astrocytes give neurons less support: implications for Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 33: 423.e1-13.
- Steinhuß SR, 2008. Why have antioxidants failed in clinical trials? *American Journal of Cardiology*, 101(10A): 14D-19D.
- Stocker-Wörgötter E, 2008. Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. *Natural Products Report*, 25(1): 188-200.
- Stocker-Wörgötter E, Cordeiro LMC, Lacomini M, Rahman A, 2013. Accumulation of potential pharmaceutically relevant lichen metabolites in lichens and cultured lichen symbionts. (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier, Amsterdam, pp. 337-380.
- Stojanovic G, Stojanovic I, Stankov-Jovanovic V, Mitic V, Kostic D, 2010. Reducing power and radical scavenging activity of four *Parmeliaceae* species. *Central European Journal of Biology*, 5(6):808-813.
- Su BN, Cuendet M, Nikolic D, Kristinsson H, Ingólfssdóttir K, van Breemen RB, Fong H, Pezzuto JM, Kinghorn AD, 2003. NMR study of fumarprotocetraric acid, a complex lichen depsidone derivative from *Cladonia furcata*. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 41: 391-394.
- Suh JH, Shenvi SV, Dixon BM, Liu H, Jaiswal AK, Liu RM, Hagen TM, 2004. Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 101(10): 3381-3386.
- Sultana R, Butterfield DA, 2013. Oxidative modification of brain proteins in Alzheimer's disease: perspective on future studies based on results of redox proteomics studies. *Journal of Alzheimers Disease*, 33(Suppl.1): S243-251.
- Sultana R, Perluigi M, Allan Butterfield D, 2013. Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: a redox proteomics view into the Alzheimer disease brain. *Free Radical Biology and Medicine*, 62: 157-169.
- Sun AY, Wang Q, Simonyi A, Sun GY. Resveratrol as a therapeutic agent for neurodegenerative diseases. *Molecular Neurobiology*, 41(2-3): 375-383.
- Sun J, He ZG, Cheng G, Wang SJ, Hao XH, Zou MJ, 2004. Multidrug resistance P-glycoprotein: crucial significance in drug disposition and interaction. *Medical Science Monitor*, 10(1): RA5-14.
- Sung JH, Chon JW, Lee MA, Park JK, Woo JT, Park YK, 2011. The anti-obesity effect of *Lethariella cladonioides* in 3T3-L1 cells and obese mice. *Nutrition Research and Practice*, 5: 503-510.
- Sureda FX, Junyent F, Verdager E, Auladell C, Pelegrí C, Vilaplana J, Folch J, Canudas AM, Zarate CB, Pallès M, Camins A, 2011. Antiapoptotic drugs: a therapeutic strategy for the prevention of neurodegenerative diseases. *Current Pharmaceutical Design*, 17(3): 230-245.
- Sureshbabu A, Syed M, Das P, Janér C, Pryhuber G, Rahman A, Andersson S, Homer RJ, Bhandari V, 2016. Inhibition of Regulatory-Associated Protein of Mechanistic Target of Rapamycin Prevents Hyperoxia-Induced Lung Injury by Enhancing Autophagy and Reducing Apoptosis in Neonatal Mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 55(5): 722-735.
- Suwalsky M, Jemiola-Rzeminska M, Astudillo C, Gallardo MJ, Staforelli JP, Villena F, Strzalka K, 2015. An *in vitro* study on the antioxidant capacity of usnic acid on human erythrocytes and molecular models of its membrane. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1848(11PtA): 2829-2838.
- Suwanjang W, Abramov AY, Charngkaew K, Govitrapong P, Chetsawang B, 2016. Melatonin prevents cytosolic calcium overload, mitochondrial damage and cell death due to toxically high doses of dexamethasone-induced oxidative stress in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurochemistry International*, 97: 34-41.
- Swomley AM, Butterfield DA, 2015. Oxidative stress in Alzheimer disease and mild cognitive impairment: evidence from human data provided by redox proteomics. *Archives of Toxicology*, 89(10): 1669-1680.
- Sykietis GP, Bohmann D, 2008. Keap1/Nrf2 signaling regulates oxidative stress tolerance and lifespan in *Drosophila*. *Development Cell*, 14(1): 76-85.
- Tabner BJ, El-Agnaf OM, Turnbull S, German MJ, Paleologou KE, Hayashi Y, Cooper LJ, Fullwood NJ, Allsop D, 2005. Hydrogen peroxide is generated during the very early stages of aggregation of the amyloid peptides implicated in Alzheimer disease and familial British dementia. *Journal of Biological Chemistry*, 280(43): 35789-35792.
- Tajes M, Ramos-Fernández E, Weng-Jiang X, Bosch-Morató M, Guvernau B, Eraso-Pichot A, Salvador B, Fernández-Busquets X, Roquer J, Muñoz FJ, 2014. The blood-brain barrier: structure, function and therapeutic approaches to cross it. *Molecular Membrane Biology*, 31(5): 152-167.

- Takahashi A, Camacho P, Lechleiter JD, Herman B, 1999. Measurement of intracellular calcium. *Physiological Reviews*, 79: 1089-1125.
- Takuma K, Baba A, Matsuda T, 2004. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Progress in Neurobiology*, 72(2): 111-127.
- Tan CC, Yu JT, Tan MS, Jiang T, Zhu XC, Tan L, 2014. Autophagy in aging and neurodegenerative diseases: implications for pathogenesis and therapy. *Neurobiology of Aging*, 35(5): 941-957.
- Tanas S, Odabasoglu F, Halici Z, Cakir A, Aygun H, Aslan A, Suleyman H, 2010. Evaluation of anti-inflammatory and antioxidant activities of *Peltigera rufescens* lichen species in acute and chronic inflammation models. *Journal of Natural Medicines*, 64(1): 42-49.
- Tangmansakulchai K, Abubakar Z, Kitiyanant N, Suwanjang W, Leepiyasakulchai C, Govitrapong P, Chetsawang B, 2016. Calpastatin overexpression reduces oxidative stress-induced mitochondrial impairment and cell death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells by decreasing calpain and calcineurin activation, induction of mitochondrial fission and destruction of mitochondrial fusion. *Mitochondrion*, 30: 151-161.
- Tanida I, Ueno T, Kominami E, 2008. LC3 and Autophagy. *Methods in Molecular Biology*, 445: 77-88.
- Tasker JG, Oliet SH, Bains JS, Brown CH, Stern JE, 2012. Glial Regulation of Neuronal Function: From Synapse to Systems Physiology. *Journal of Neuroendocrinology*, 24: 566-576.
- Tauskela JS, 2007. MitoQ - a mitochondria-targeted antioxidant. *IDrugs*, 10(6): 399-412.
- Tetko IV, Gasteiger J, Todeschini R, Mauri A, Livingstone D, Ertl P, Palyulin VA, Radchenko EV, Zefirov NS, Makarenko AS, Tanchuk VY, Prokopenko VV, 2005. Virtual computational chemistry laboratory - design and description. *Journal of Computer-Aid Molecular Design*, 19: 453-463.
- Thanan R, Oikawa S, Hiraku Y, Ohnishi S, Ma N, Pinlaor S, Yongvanit P, Kawanishi S, Murata M, 2014. Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1): 193-217.
- Thell A, Crespo A, Divakar PK, Kärnefelt I, Leavitt SD, Lumbsch HT, MRD Seaward, 2012. A review of the lichen family *Parmeliaceae* – history, phylogeny and current taxonomy. *Nordic Journal of Botany*, 30(6): 641-664.
- Thell A, Högnabba F, Elix JA, Feuerer T, Kärnefelt I, Myllys L, Randle T, Saag A, Stenroos S, Ahti T, Seaward MRD, 2009. Phylogeny of the cetrarioid core (*Parmeliaceae*) based on five genetic markers. *Lichenologist*, 41: 489-511.
- Tommonaro G, García-Font N, Vitale RM, Pejin B, Iodice C, Cañadas S, Marco-Contelles J, Oset-Gasque MJ, 2016. Avarol derivatives as competitive AChE inhibitors, non hepatotoxic and neuroprotective agents for Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 122: 326-338.
- Tong KI, Padmanabhan B, Kobayashi A, Shang C, Hirotsu Y, Yokoyama S, Yamamoto M, 2007. Different electrostatic potentials define ETGE and DLG motifs as hinge and latch in oxidative stress response. *Molecular and Cellular Biology*, 27(21): 7511-7521.
- Tretter ED, Johnson EM, Wang Y, Kandel P, White MM, 2013. Examining new phylogenetic markers to uncover the evolutionary history of early-diverging fungi: comparing MCM7, TSR1 and rRNA genes for single- and multi-gene analyses of the Kickxellomycotina. *Persoonia*, 30: 106-125.
- Trippier PC, 2016. Selecting Good 'Drug-Like' Properties to Optimize Small Molecule Blood-Brain Barrier Penetration. *Current Medicinal Chemistry*, 23(14): 1392-1407.
- Trippier PC, Jansen Labby K, Hawker DD, Mataka JJ, Silverman RB, 2013. Target- and mechanism-based therapeutics for neurodegenerative diseases: strength in numbers. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(8): 3121-3147.
- Tschermak-Woess E, 1988. The algal partner. In: *Handbook of Lichenology*. Volume I. M. Galun (ed.) CRC Press, Inc., Boca Raton, pp. 39-94.
- Turkez H, Aydin E, Aslan A, 2011. *Xanthoria elegans* (Link) (lichen) extract counteracts DNA damage and oxidative stress of mitomycin C in human lymphocytes. *Cytotechnology*, 64: 679-686.
- Uğuz AC, Öz A, Nazıroğlu M, 2016. Curcumin inhibits apoptosis by regulating intracellular calcium release, reactive oxygen species and mitochondrial depolarization levels in SH-SY5Y neuronal cells. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*; 36(4): 395-401.
- Upreti DK, Tiwari P, Shukla P, Dwivedi A, 2012. Natural thalli and cultured mycobiont of *Usnea ghattensis* G. Awasthi- a potential source of purple dye yielding lichen from India. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 3(4): 489-492.
- Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT, 2009. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*, 7(1): 65-74.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J, 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39: 44-84.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M, 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico Biological Interactions*, 160(1): 1-40.
- Van de Waterbeemd H, Camenisch G, Folkers G, Chretien JR, Raevsky OA, 1998. Estimation of blood-brain barrier crossing of drugs using molecular size and shape, and H-bonding descriptors. *Journal of Drug Targeting*, 6: 151-165.
- Vareed S K, Bauer AK, Nair KM, Liu Y, Jayaprakasam B, Nair MG, 2014. Blood-Brain Barrier Permeability of Bioactive Withanamides Present in *Withania somnifera* Fruit Extract. *Phytotherapy Research*, 28: 1260-1264.

- Vartia KO, 1973. Antibiotics in lichens. In: Ahmadjian V, Hale ME. The lichens, Academic Press. New York.
- Veal EA, Day AM, Morgan BA, 2007. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Molecular Cell*, 26(1): 1-14.
- Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD, 2002. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(12): 2615-2623.
- Verkhatsky A, Parpura V, Pekna M, Pekny M, Sofroniew M, 2014. Glia in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Biochemical Society Transactions*, 42(5): 1291-1301.
- Verma N, Behera BC, Makhija U, 2008. Antioxidant and hepatoprotective activity of a lichen *Usnea ghattensis* *in vitro*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151(2-3): 167-181.
- Veryser L, Taevernier L, Joshi T, Tatke P, Wynendaele E, Bracke N, Stalmans S, Peremans K, Burvenich C, Risseuw M, De Spiegeleer B, 2016. Mucosal and blood-brain barrier transport kinetics of the plant N-alkylamide spilanthol using *in vitro* and *in vivo* models. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16: 177.
- Vijayakumar CS, Viswanathan S, Reddy MK, Parvathavarthini S, Kundu AB, Sukumar E, 2000. Antiinflammatory activity of (+)-usnic acid. *Fitoterapia*, 71: 564-566.
- Vijayvergiya C, Beal MF, Buck J, Manfredi G, 2005. Mutant superoxide dismutase 1 forms aggregates in the brain mitochondrial matrix of amyotrophic lateral sclerosis mice. *Journal of Neuroscience*, 25: 2463-2470.
- Vina J, Gambini J, Lopez-Grueso R, Abdelaziz KM, Jove M, Borras C, 2011. Females live longer than males: role of oxidative stress. *Current Pharmaceutical Design*, 17(36): 3959-3965.
- Walker FO, 2007. Huntington's disease. *Lancet*, 369(9557): 218-222.
- Walker JM, 1994. The bichinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods in Molecular Biology*, 32: 5-8.
- Wang CH, Wu SB, Wu YT, Wei YH, 2013. Oxidative stress response elicited by mitochondrial dysfunction: implication in the pathophysiology of aging. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, 238(5): 450-460.
- Wang J, Jiang H, Xie JX, 2007. Ferroportin1 and hephaestin are involved in the nigral iron accumulation of 6-OHDA-lesioned rats. *European Journal of Neuroscience*, 25: 2766-2772.
- Wang P, Guan YF, Du H, Zhai QW, Su DF, Miao CY, 2012. Induction of autophagy contributes to the neuroprotection of nicotinamide phosphoribosyltransferase in cerebral ischemia. *Autophagy*, 8(1): 77-87.
- Wang X, Michaelis EK, 2010. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2: 12.
- Wang Y, Wang J, Cheong YH, Hur JS, 2014. Three New Non-reducing Polyketide Synthase Genes from the Lichen-Forming Fungus *Usnea longissima*. *Mycobiology*, 42(1): 34-40.
- Weber T, Blin K, Duddela S, Krug D, Kim DU, Bruccoleri R, Lee SY, Fischbach MA, Müller R, Wohlleben W, Breitling R, Takano E, Medema MH, 2015. AntiSMASH 3.0 - a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Research*, 43(W1): W237-W243.
- Wei AH, Zhou DN, Ruan JL, Cai YL, Xiong CM, Li MX, 2012. Characterisation of phenols and antioxidant and hypolipidaemic activities of *Lethariella cladonioides*, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92: 373-379.
- Weishaupt JH, Bartels C, Pölking E, Dietrich J, Rohde G, Poeggeler B, Mertens N, Sperling S, Bohn M, Hütther G, Schneider A, Bach A, Sirén A, Hardeland R, Bähr M, Nave K, Ehrenreich H, 2006. Reduced oxidative damage in ALS by high dose enteral melatonin treatment. *Journal of Pineal Research*, 41: 313-323.
- Weksler B, Romero IA, Couraud PO, 2013. The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. *Fluids and Barriers of the CNS*, 10(1): 16.
- White PA, Oliveira RC, Oliveira AP, Serafini MR, Araújo AA, Gelain DP, Moreira JC, Almeida JR, Quintans JS, Quintans-Junior LJ, Santos MR, 2014. Antioxidant activity and mechanisms of action of natural compounds isolated from lichens: a systematic review. *Molecules*, 19(9): 14496-14527.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications* (ed. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ), pp. 315-322. Academic Press, San Diego, U.S.A.
- Willis AW, 2013. Parkinson disease in the elderly adult. *Missouri Medicine*, 110: 406-410.
- Wirtz N, Printzen C, Sancho LG, Lumbsch HT, 2006. The phylogeny and classification of *Neuropogon* and *Usnea* (*Parmeliaceae*, *Ascomycota*) revisited. *Taxon*, 55(2): 367-376.
- Wong HL, Wu XY, Bendayan R, 2012. Nanotechnological advances for the delivery of CNS therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(7): 686-700.
- Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND, 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *The Journal of Nutrition*, 134(3): 489-492.
- Wu Y, Li X, Zhu JX, Xie W, Le W, Fan Z, Jankovic J, Pan T, 2011. Resveratrol-activated AMPK/SIRT1/autophagy in cellular models of Parkinson's disease. *Neurosignals*, 19(3): 163-174.
- Xia SH, Fang DC, 2007. Pharmacological action and mechanisms of ginkgolide B. *Chinese Medical Journal (Engl)*, 120(10): 922-928.
- Xie HR, Hu LS, Li GY, SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chinese Medical Journal*, 123(8): 1086-1092.
- Xu B, Li C, Sung C, 2014. Telomerase inhibitory effects of medicinal mushrooms and lichens, and their anticancer activity. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 16(1): 17-28.



- Xu K, Xu P, Yao JF, Zhang YG, Hou WK, Lu SM, 2013. Reduced apoptosis correlates with enhanced autophagy in synovial tissues of rheumatoid arthritis. *Inflammation Research*, 62(2): 229-237.
- Xu M, Heidmarsson S, Olafsdottir ES, Buonfiglio R, Kogej T, Omarsdottir S, 2016. Secondary metabolites from cetrarioid lichens: Chemotaxonomy, biological activities and pharmaceutical potential. *Phytomedicine*, 23(5): 441-459.
- Yahr R, Schoch CL, Dentinger BT, 2016. Scaling up discovery of hidden diversity in fungi: impacts of barcoding approaches. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences*, 371: 1702.
- Yalcin G, Sogut O, 2014. Influence of extraction solvent on antioxidant capacity value of oleaster measured by ORAC method. *Natural Products Research*, 28(18): 1513-1517.
- Yamada KD, Tomii K, Katoh K, 2016. Application of the MAFFT sequence alignment program to large data-reexamination of the usefulness of chained guide trees. *Bioinformatics*, 32(21): 3246-3251.
- Yamamoto Y, Miura Y, Kinoshita Y, Higuchi M, Yamada Y, Murakami A, Ohigashi H, Koshimizu K, 1995. Screening of tissue cultures and thalli of lichens and some of their active constituents for inhibition of tumor promoter induced Epstein-Barr virus activation. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 43: 1388-1390.
- Yan LJ, Levine RL, Sohal RS, 1997. Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 94(21): 11168-11172.
- Yang Y, Nguyen TT, Jeong MH, Crişan F, Yu YH, Ha HH, Choi KH, Jeong HG, Jeong TC, Lee KY, Kim KK, Hur JS, Kim H, 2016. Inhibitory Activity of (+)-Usnic Acid against Non-Small Cell Lung Cancer Cell Motility. *PLoS One*, 11(1): e0146575.
- Yarim M, Koksall M, Durmaz I, Atalay R, 2012. Cancer cell cytotoxicities of 1-(4-substitutedbenzoyl)-4-(4-chlorobenzhydryl)piperazine derivatives. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7): 8071-8085.
- Yin J, Duan J, Cui Z, Ren W, Li T, Yin Y, 2015. Hydrogen peroxide-induced oxidative stress activates NF- $\kappa$ B and Nrf2/Keap1 signals and triggers autophagy in piglets. *RSC Advances*, 5: 15479-1548.
- Yoshimura I, Kinoshita Y, Yamamoto Y, Huneck S, Yamada Y, 1994b. Analysis of secondary metabolites from lichen by high performance liquid chromatography with a photodiode array detector. *Phytochemical Analysis*, 5: 197-205.
- Yoshimura I, Kurokawa T, Kinoshita Y, Yamamoto Y, Miyawaki H, 1994a. Lichen substances in cultured lichens. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory*, 76: 249-261.
- Zambare VP, Christopher LP, 2012. Biopharmaceutical potential of lichens. *Pharmaceutical Biology*, 50(6): 778-798.
- Zhang C, Yang L, Wang XB, Wang JS, Geng YD, Yang CS, Kong LY, 2013. Calyxin Y induces hydrogen peroxide-dependent autophagy and apoptosis via JNK activation in human non-small cell lung cancer NCI-H460 cells. *Cancer Letters*, 340(1): 51-62.
- Zhang G, Wang Q, Zhou Q, Wang R, Xu M, Wang H, Wang L, Wilcox CS, Liu R, Lai EY, 2016. Protective Effect of Tempol on Acute Kidney Injury through PI3K/Akt/Nrf2 Signaling Pathway. *Kidney and Blood Pressure Research*, 41(2): 129-138.
- Zhang H, Kong X, Kang J, Su J, Li Y, Zhong J, Sun L, 2009. Oxidative stress induces parallel autophagy and mitochondria dysfunction in human glioma U251 cells. *Toxicological Sciences*, 110(2): 376-388.
- Zhang J, Kobert K, Flouri T, Stamatakis A, 2014. PEAR: A fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics*, 30(5): 614-620.
- Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, Dong W, 2016. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016: 4350965.
- Zhang M, An C, Gao Y, Leak RK, Chen J, Zhang F, 2013. Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection. *Progress in Neurobiology*, 100: 30-47.
- Zhang M, Luo G, Zhou Y, Wang S, Zhong Z, 2014. Phenotypic screens targeting neurodegenerative diseases. *Journal of Biomolecular Screening*, 19(1): 1-16.
- Zhang S, Ye J, Dong G, 2010. Neuroprotective effect of baicalein on hydrogen peroxide-mediated oxidative stress and mitochondrial dysfunction in PC12 cells. *Journal of Molecular Neuroscience*, 40(3): 311-320.
- Zhang SM, Hernán MA, Chen H, Spiegelman D, Willett WC, Ascherio A, 2002. Intakes of vitamins E and C, carotenoids, vitamin supplements, and PD risk. *Neurology*, 59: 1161-1169.
- Zhang Z, Wang X, Chen Q, Shu L, Wang J, Shan G, 2002. Clinical efficacy and safety of huperzine Alpha in treatment of mild to moderate Alzheimer disease, a placebo-controlled, double-blind, randomized trial. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 82(14): 941-944.
- Zhao K, Zhao GM, Wu D, Soong Y, Birk AV, Schiller PW, Szeto HH, 2004. Cell-permeable peptide antioxidants targeted to inner mitochondrial membrane inhibit mitochondrial swelling, oxidative cell death, and reperfusion injury. *Journal of Biological Chemistry*, 279(33): 34682-34690.
- Zhong JJ, Xiao JH, 2009. Secondary metabolites from higher fungi: discovery, bioactivity, and bioproduction. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 113: 79-150.
- Zhou H, Wang J, Jiang J, Stavrovskaya IG, Li M, Li W, Wu Q, Zhang X, Luo C, Zhou S, Sirianni AC, Sarkar S, Kristal BS, Friedlander RM, Wang X, 2014. N-acetyl-serotonin offers neuroprotection through inhibiting mitochondrial death pathways and autophagic activation in experimental models of ischemic injury. *Cell Death and Disease*, 5: 2967-2978.
- Zopf W, 1985. Zur Kenntniss der Flechtenstoffe. *Annali di Chimica*, 284: 107-132.

- Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ, 2014. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiological Reviews*, 94(3): 909-950.
- Zou Y, Hong B, Fan L, Zhou L, Liu Y, Wu Q, Zhang X, Dong M, 2013. Protective effect of puerarin against beta-amyloid-induced oxidative stress in neuronal cultures from rat hippocampus: involvement of the GSK-3 $\beta$ /Nrf2 signaling pathway. *Free Radical Research*, 47: 55- 63.
- Zündorf G, Reiser G, 2011. Calcium dysregulation and homeostasis of neural calcium in the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases provide multiple targets for neuroprotection. *Antioxidants and Redox Signaling*, 14(7): 1275-1288.

